

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA



COMPORTAMIENTO OXIDATIVO DE ACEITES MICROENCAPSULADOS:
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN EN SISTEMAS
MODELOS Y ESTUDIOS ESPECÍFICOS EN ALIMENTOS

Tesis Doctoral

Francisca Holgado Arroyo

Madrid, 2011



Consejo Superior de Investigaciones Científicas

COMPORTAMIENTO OXIDATIVO DE ACEITES MICROENCAPSULADOS: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN EN SISTEMAS MODELOS Y ESTUDIOS ESPECÍFICOS EN ALIMENTOS

Memoria que presenta Francisca Holgado Arroyo
para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Bajo la dirección de la Dra. Gloria Márquez-Ruiz
y del Dr. Joaquín Velasco Jiménez.



GLORIA MÁRQUEZ RUIZ, DOCTORA EN FARMACIA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y JOAQUÍN VELASCO JIMÉNEZ, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE LA GRASA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “COMPORTAMIENTO OXIDATIVO DE ACEITES MICROENCAPSULADOS: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN EN SISTEMAS MODELOS Y ESTUDIOS ESPECÍFICOS EN ALIMENTOS”, que constituye la Memoria de la que es autora Francisca Holgado Arroyo, ha sido realizado en el Instituto del Frío (actualmente Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición) del C.S.I.C. bajo su dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y, por tanto, autorizan su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente Certificado en Madrid a 22 de Diciembre de 2010.

Los Directores de la Tesis

Fdo. Gloria Márquez Ruiz

Fdo. Joaquín Velasco Jiménez

Vº Bº

Fdo. Laura Jaime de Pablo



EN 13064:2008
ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

1.- INTRODUCCIÓN

| | |
|---|-----------|
| 1.1.- ACEITES MICROENCAPSULADOS | 1 |
| 1.1.1.- Aceites microencapsulados: ingredientes y alimentos | 1 |
| 1.1.1.1.- Aceites esenciales | 1 |
| 1.1.1.2.- Aceites ricos en ácidos grasos ω -3 | 2 |
| 1.1.1.3.- Aceites ricos en ácido linoleico conjugado (CLA) | 2 |
| 1.1.1.4.- Vitaminas liposolubles | 3 |
| 1.1.1.5.- Leches en polvo | 3 |
| 1.1.1.6.- Formulas infantiles en polvo | 4 |
| 1.1.2.- Preparación de aceites microencapsulados | 5 |
| 1.1.2.1.- Matriz encapsulante | 5 |
| 1.1.2.2.- Técnicas de microencapsulación | 8 |
| 1.1.3.- Características fisicoquímicas de los aceites microencapsulados | 10 |
| 1.1.3.1.- Distribución del aceite | 10 |
| 1.1.3.2.- Tamaño de glóbulo de aceite | 13 |
| 1.1.3.3.- Actividad de agua | 14 |
| 1.1.3.4.- Temperatura de transición vítrea (T _g) | 15 |
| 1.1.3.5.- Densidad | 16 |
| 1.1.3.6.- Color | 17 |
| 1.1.3.7.- Solubilidad en agua | 17 |
| 1.1.3.8.- Tamaño de las partículas de polvo | 18 |
| 1.1.3.9.- Viscosidad | 19 |
| 1.1.3.10.- Porosidad | 19 |
| 1.2.-OXIDACIÓN LIPÍDICA. AUTOXIDACIÓN | 20 |
| 1.2.1.- Proceso de autoxidación y compuestos formados | 20 |
| 1.2.1.1.- Compuestos primarios de oxidación | 22 |
| 1.2.1.2.- Compuestos secundarios de oxidación | 22 |
| 1.2.2.- Métodos analíticos para la evaluación de la oxidación lipídica | 25 |
| 1.2.2.1.- Evaluación del estado de oxidación | 25 |
| 1.2.2.2.- Determinación de la estabilidad oxidativa mediante métodos acelerados | 30 |
| 1.3.- OXIDACIÓN LIPÍDICA EN ACEITES MICROENCAPSULADOS | 31 |
| 1.3.1.- Parámetros | 32 |
| 1.3.1.1.- Composición de la matriz | 32 |
| 1.3.1.2.- Métodos de secado | 34 |
| 1.3.1.3.- Grado de homogeneización | 34 |
| 1.3.2. Variables | 35 |
| 1.3.2.1.- Distribución de los lípidos (Eficacia de encapsulación) | 35 |
| 1.3.2.2.- Tamaños de glóbulos de aceite | 36 |
| 1.3.2.3.- Actividad de agua | 37 |

| | |
|--|----|
| 1.3.2.4.- Cambios estructurales de la matriz. | 38 |
| 1.3.2.5.- Tamaño de partículas de polvo | 40 |
| 1.3.2.6.- Antioxidantes | 40 |
| <u>2.- OBJETIVOS</u> | 44 |
| <u>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 45 |
| 3.1.- REACTIVOS | 45 |
| 3.2.- MUESTRAS | 46 |
| 3.2.1.- Aceites | 46 |
| 3.2.2.- Aceites microencapsulados | 46 |
| 3.2.2.1.- Matrices | 46 |
| 3.2.2.2.- Preparación de las emulsiones | 47 |
| 3.2.2.3.- Secado | 47 |
| 3.2.2.4.- Molienda | 48 |
| 3.2.3.- Aceite Tonalin® microencapsulado | 48 |
| 3.2.4.- Fórmulas infantiles comerciales | 48 |
| 3.3.- CARACTERIZACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS | 49 |
| 3.3.1.- Eficacia de encapsulación | 49 |
| 3.3.1.1.- Extracción de la fracción libre o no encapsulado | 49 |
| 3.3.1.2.- Extracción de la fracción total de aceite | 49 |
| 3.3.2.- Tamaño promedio de glóbulos de aceite y dispersión de tamaños | 50 |
| 3.3.3.- Tamaño de partículas de polvo | 51 |
| 3.3.4.- Actividad de agua | 52 |
| 3.3.5.- Temperatura de transición vítrea | 52 |
| 3.3.6.- Densidad a granel y compresibilidad de aceites microencapsulados | 52 |
| 3.3.7.- Medidas del color | 53 |
| 3.3.8.- Solubilidad en agua de aceites microencapsulados | 54 |
| 3.3.9.- Índice de estabilidad oxidativa en Rancimat | 54 |
| 3.3.10.- Composición en ácidos grasos | 55 |
| 3.3.11.- Determinación de compuestos de oxidación e hidrólisis | 55 |
| 3.4.- ENSAYOS DE OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS | 58 |
| 3.5.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS | 58 |
| 3.5.1.- Extracción de la fracción de aceite libre | 58 |
| 3.5.2.- Extracción de la fracción de aceite encapsulado | 58 |
| 3.5.3.- Extracción de la fracción total de aceite | 59 |

3.6.- EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO 59

| | |
|---|----|
| 3.6.1.- Índice de peróxidos | 59 |
| 3.6.2.- Determinación de polímeros | 60 |
| 3.6.3.- Determinación pérdida de sustrato | 61 |
| 3.6.4.- Determinación de tocoferoles | 61 |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- INFLUENCIA DEL TIPO DE MATRIZ Y DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ACEITES MICROENCAPSULADOS 63

| | |
|--|----|
| 4.1.1.- Muestras liofilizadas | 65 |
| 4.1.1.1. Eficacia de encapsulación | 65 |
| 4.1.1.2. Tamaño promedio de glóbulos de aceite y dispersión de tamaños | 68 |
| 4.1.1.3. Tamaño de partículas de polvo | 74 |
| 4.1.1.4. Actividad de agua | 75 |
| 4.1.1.5. Temperatura de transición vítrea | 75 |
| 4.1.1.6. Densidad a granel ("bulk density") | 80 |
| 4.1.1.7. Color | 83 |
| 4.1.1.8. Solubilidad y pH | 84 |
| 4.1.2.- Muestras atomizadas | 86 |
| 4.1.3.- Evaluación conjunta de la influencia del tipo de matriz, presión de homogeneización y método de secado sobre las propiedades fisicoquímicas de aceites microencapsulados | 92 |

4.2.- OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS ELABORADOS EN EL LABORATORIO O EN PLANTA PILOTO 100

| | |
|--|-----|
| 4.2.1.- Influencia del método de secado en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados | 102 |
| 4.2.1.1. Comportamiento oxidativo del aceite de girasol (fase continua) | 107 |
| 4.2.1.2. Comportamiento oxidativo del aceite encapsulado: muestras con matriz láctea | 108 |
| 4.2.1.3. Comportamiento oxidativo del aceite de girasol encapsulado: muestras con matriz de maltodextrina | 118 |
| 4.2.2.- Influencia de la presión de homogeneización en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados | 127 |
| 4.2.2.1. Muestras con matriz láctea | 129 |
| 4.2.2.2. Muestras con matriz de maltodextrina | 132 |
| 4.2.3.- Evaluación conjunta de la influencia del tipo de matriz, presión de homogeneización y método de secado en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados | 138 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.- OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS EN ALIMENTOS | 144 |
| 4.3.1.- Producto lácteo en polvo con aceite rico en CLA (aceite Tonalin®) | 144 |
| 4.3.1.1.- Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin® (fase continua) | 145 |
| 4.3.1.2.- Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin® microencapsulado(TM) | 148 |
| 4.3.1.3.- Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin® microencapsulado exento de aceite libre | 161 |
| 4.3.2.- Fórmulas infantiles | 166 |
| 4.3.2.1.- Composición y caracterización de las fórmulas infantiles | 166 |
| 4.3.2.2.- Comportamiento oxidativo de las fórmulas infantiles | 172 |
| <u>5. CONCLUSIONES</u> | 183 |
| <u>6. BIBLIOGRAFÍA</u> | 185 |

ABREVIATURAS

AG: Ácidos grasos libres

a^* y b^* : Coordenadas de cromaticidad

A: Densidad aireada

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

ASE: Área de superficie específica

a_w : Actividad de agua

C.P.: Compuestos polares totales

CG: Cromatografía de gases

CLA: Ácido linoleico conjugado

$d_{(v,0,9)} - d_{(v,0,1)}$: Rango de diámetros de gotas de aceite

D [3,2]: Diámetro de Sauter

$d_{(v,0,5)}$: Diámetro promedio de gotas de aceite

DE: Equivalente de dextrosa

DG: Diglicéridos

DHA: Ácido docosahexaenoico

Dim: Dímeros

DSC: Calorimetría diferencial de barrido (Differential scanning calorimetry)

EE: Eficacia de encapsulación

ENC: Fracción de aceite encapsulado

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ESR: Espectroscopía de espín electrónico (Electron spin resonance spectroscopy)

FI: Fórmula infantil

FTIR: Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography)

HPSEC: Cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (High-performance size-exclusion chromatography)

IP: Índice de peróxidos

L^* : Luminosidad

LA70: Muestra de aceite de girasol microencapsulado en matriz láctea, atomizada y preparada a 70 MPa

LIB: Fracción de aceite libre

LL15: Muestra de aceite de girasol microencapsulado en matriz láctea, liofizada y preparada a 15 MPa

LL70: Muestra de aceite de girasol microencapsulado en matriz láctea, liofizada y preparada a 70 MPa

MA70: Muestra de aceite de girasol microencapsulado en matriz de maltodextrina, atomizada y preparada a 70 MPa

MD: Maltodextrina

ML70: Muestra de aceite de girasol microencapsulado en matriz de maltodextrina, liofilizada y preparada a 70 MPa

nd: No determinado

OSI: Índice de estabilidad oxidativa (Oxidative stability index)

P: Densidad empacada

p: Probabilidad

PI: Periodo de inducción

Pol: Polímeros

RMN: Resonancia magnética nuclear

Tg: Temperatura de transición vítrea

TGMox: Triglicéridos monómeros oxidados

TM: Aceite Tonalin[®] microencapsulado

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabla 4.1. | Distribución lipídica en los aceites microencapsulados..... | 65 |
| Tabla 4.2. | Análisis de varianza de un factor para los valores de la eficacia de encapsulación..... | 66 |
| Tabla 4.3. | Tamaños de gotas de aceite obtenidos en el rango 0,05 – 80 µm (lente 45 mm) en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo..... | 71 |
| Tabla 4.4. | Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de varianza de un factor..... | 72 |
| Tabla 4.5. | Actividad de agua de los aceites microencapsulados..... | 75 |
| Tabla 4.6. | Medidas de la temperatura de transición vítrea de los aceites microencapsulados..... | 79 |
| Tabla 4.7. | Valores de densidad de los aceites microencapsulados y contenido de aire intersticial..... | 81 |
| Tabla 4.8. | Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de varianza de un factor para los valores de densidad a granel..... | 82 |
| Tabla 4.9. | Valores de luminosidad y coordenadas de cromaticidad de los aceites microencapsulados..... | 83 |
| Tabla 4.10. | Tiempos necesarios para alcanzar la solubilidad (t) y valores de pH de las emulsiones reconstituidas..... | 84 |
| Tabla 4.11. | Características fisicoquímicas de los aceites microencapsulados obtenidos mediante secado por liofilización y atomización. Condiciones de homogeneización: 1 x 70 MPa..... | 87 |
| Tabla 4.12. | Muestras de aceites de girasol microencapsulados seleccionadas para los estudios de oxidación..... | 100 |
| Tabla 4.13. | Caracterización del aceite de girasol utilizado en la elaboración de aceites microencapsulados..... | 101 |
| Tabla 4.14. | Influencia del tipo de matriz y el método de secado sobre parámetros oxidativos e hidrolíticos en los aceites microencapsulados..... | 103 |
| Tabla 4.15. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (70 MPa) atomizada..... | 123 |
| Tabla 4.16. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (70 MPa) liofilizada..... | 124 |
| Tabla 4.17. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (70 MPa) atomizada..... | 125 |
| Tabla 4.18. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (70 MPa) liofilizada..... | 126 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tabla 4.19. | Parámetros indicadores de cambios oxidativos e hidrolíticos en el aceite inicial y en los aceites microencapsulados..... | 128 |
| Tabla 4.20. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (15 MPa) liofilizada..... | 136 |
| Tabla 4.21. | Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (15 MPa) liofilizada..... | 137 |
| Tabla 4.22. | Caracterización inicial de los aceites de cártamo y Tonalin® | 146 |
| Tabla 4.23. | Evolución de la oxidación de los aceites de cártamo y Tonalin® | 146 |
| Tabla 4.24. | Características fisicoquímicas de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1 y TM 2..... | 149 |
| Tabla 4.25. | Caracterización de los aceites extraídos de las muestras iniciales de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1 y TM 2..... | 152 |
| Tabla 4.26. | Evolución de la oxidación de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1..... | 153 |
| Tabla 4.27. | Evolución de la oxidación de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 2..... | 153 |
| Tabla 4.28. | Evolución de la pérdida de sustrato y de la formación de compuestos de polimerización en la fracción de aceite encapsulado de las muestras TM1...160 | |
| Tabla 4.29. | Características fisicoquímicas de las muestras TM2 y TM2 sin aceite libre...161 | |
| Tabla 4.30. | Evolución de la oxidación de la muestra de aceite Tonalin® microencapsulado TM2 sin aceite libre..... | 164 |
| Tabla 4.31. | Composición nutricional de las fórmulas infantiles estudiadas..... | 167 |
| Tabla 4.32. | Características fisicoquímicas de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2..... | 168 |
| Tabla 4.33. | Caracterización de los aceites extraídos de las muestras iniciales de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2..... | 172 |
| Tabla 4.34. | Evolución de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 1..... | 174 |
| Tabla 4.35. | Evolución de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 2..... | 174 |
| Tabla 4.36. | Rendimiento de extracción e índice de peróxidos (IP) obtenidos (por duplicado) en la fracción de aceite encapsulado extraída en fórmulas infantiles mediante mortero-éter dietílico y mediante el método de Folch (cloroformo/metanol 2:1)..... | 178 |
| Tabla 4.37. | Evaluación de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2 almacenadas a 25°C durante 30 meses..... | 179 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 1.1. | Representación esquemática de la extracción diferenciada de las fracciones superficial y encapsulada de aceites microencapsulados y cálculo de la eficacia de encapsulación..... | 11 |
| Figura 1.2. | Formación de compuestos secundarios con funciones hidroxil y cetona..... | 23 |
| Figura 1.3. | Reacción de β -escisión de los hidroperóxidos involucrados en la formación de los compuestos volátiles..... | 24 |
| Figura 4.1. | Distribución de tamaños de glóbulos de aceite en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo, medidas con la lente de 100 mm en un rango de 0,2 a 180 μm | 69 |
| Figura 4.2. | Distribución de tamaños de glóbulos en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo, medidas con la lente de 45 mm en un rango de 0,05 a 80 μm | 70 |
| Figura 4.3. | Curvas DSC encontradas en muestras de matriz láctea..... | 77 |
| Figura 4.4. | Curvas DSC encontradas en muestras de matriz de maltodextrina..... | 78 |
| Figura 4.5. | Distribución de tamaños de gotas de aceite en las muestras atomizadas con matriz láctea (-■-) y matriz de maltodextrina (-●-) con lente de 45 mm..... | 88 |
| Figura 4.6. | Distribución de tamaños de gotas de aceite en las muestras atomizadas con matriz láctea (-■-) y matriz de maltodextrina (-●-) con lente de 100 mm..... | 88 |
| Figura 4.7. | Análisis de componentes principales para el conjunto total de datos de la matriz formada por 17 variables y 10 casos. A Proyección de casos en el plano delimitado por las dos primeras componentes principales. B Representación gráfica de los factores de carga..... | 95 |
| Figura 4.8. | Análisis de componentes principales para el conjunto de datos correspondientes a las muestras lácteas (17 variables x 5 casos). A Proyección de casos en el plano delimitado por las dos primeras componentes principales. B Representación gráfica de los factores de carga..... | 96 |
| Figura 4.9. | Análisis de componentes principales para el conjunto de datos correspondientes a las muestras de matriz de maltodextrina (17 variables x 5 casos). A Proyección de casos en el plano delimitado por las dos primeras componentes principales. B Representación gráfica de los factores de carga..... | 97 |
| Figura 4.10. | Registros de la medida de estabilidad oxidativa en Rancimat a 100 °C (aumento de la conductividad, $\mu\text{S cm}^{-1}$, frente al tiempo, expresado en horas) correspondientes a aceites microencapsulados preparados a 70MPa: con matriz láctea obtenidos por liofilización (LL70) y atomización (LA70) y con | |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| | matriz de maltodextrina obtenidos por liofilización (ML70) y atomización (MA70)..... | 105 |
| Figura 4.11. | Evolución de la oxidación en aceite de girasol a 30 °C y oscuridad..... | 107 |
| Figura 4.12. | Evolución de la oxidación en el aceite total extraído de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0% y oscuridad..... | 109 |
| Figura 4.13. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad..... | 111 |
| Figura 4.14. | Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad... | 113 |
| Figura 4.15. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LL70 sometida a 30 °C, HR de 0% y oscuridad..... | 114 |
| Figura 4.16. | Influencia del método de secado sobre el comportamiento oxidativo de la muestra de matriz láctea..... | 117 |
| Figura 4.17. | Influencia del método de secado sobre el comportamiento oxidativo de la muestra de matriz de maltodextrina..... | 119 |
| Figura 4.18. | Evolución de la eficacia de encapsulación (EE) de las muestras MA70 y ML 70 durante el almacenamiento a 30 °C, 0 % HR y oscuridad..... | 121 |
| Figura 4.19. | Registros de la medida de estabilidad oxidativa en Rancimat (aumento de la conductividad, $\mu\text{S cm}^{-1}$, frente al tiempo, h) correspondiente a aceites microencapsulados preparados a 15 MPa y secados mediante liofilización con matriz láctea (LL15) y con matriz de maltodextrina (ML15)..... | 129 |
| Figura 4.20. | Influencia de la presión de homogeneización sobre el comportamiento oxidativo de la muestra con matriz láctea..... | 131 |
| Figura 4.21. | Influencia de la presión de homogeneización sobre el comportamiento oxidativo de la muestra con matriz de maltodextrina..... | 133 |
| Figura 4.22. | Evolución de la eficacia de encapsulación (EE) de la muestra ML15 durante el almacenamiento a 30 °C, 0 % HR y oscuridad..... | 134 |
| Figura 4.23. | Tiempo de almacenamiento necesario para alcanzar un valor de índice de peróxidos de 100 meq/kg..... | 141 |
| Figura 4.24. | Evolución de la oxidación en los aceites de cártamo y Tonalin® a 30 °C y oscuridad..... | 147 |
| Figura 4.25. | Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra TM1..... | 150 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Figura 4.26. | Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra TM2..... | 151 |
| Figura 4.27. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 1 almacenadas a 30 °C, HR de 0% y oscuridad..... | 154 |
| Figura 4.28. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 2 almacenadas a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad..... | 155 |
| Figura 4.29. | Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones de aceite libre extraído de la muestra TM 1 en el momento inicial y a los 35 días de almacenamiento a 30 °C..... | 156 |
| Figura 4.30. | Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 1 y TM 2 sometidas a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad..... | 157 |
| Figura 4.31. | Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra TM 2 sin aceite libre..... | 163 |
| Figura 4.32. | Evolución de la oxidación en el aceite (encapsulado) extraído de muestras TM2 sin aceite libre almacenadas a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad..... | 164 |
| Figura 4.33. | Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite encapsulado extraído de muestras TM 2 y del aceite (encapsulado) de la muestra TM 2 sin aceite libre almacenadas a 30 °C, HR de 0% y oscuridad..... | 165 |
| Figura 4.34. | Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra FI 1... | 169 |
| Figura 4.35. | Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra FI 2... | 170 |
| Figura 4.36. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras FI 1 almacenadas a 30°C, HR de 0% y oscuridad.... | 175 |
| Figura 4.37. | Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras FI 2 almacenadas a 30°C, HR de 0% y oscuridad..... | 176 |

1. INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

El estado del conocimiento del tema desarrollado en esta Tesis se ha estructurado en tres apartados, en el primero se describen aspectos generales de los aceites microencapsulados, el segundo resume los mecanismos de la oxidación lipídica y los métodos de evaluación, y el tercero se ha centrado en los antecedentes más directamente relacionados con el tema de esta Tesis, es decir, la oxidación de aceites microencapsulados.

1.1.- ACEITES MICROENCAPSULADOS

Los aceites microencapsulados son ingredientes en polvo preparados mediante secado de emulsiones formuladas, donde los glóbulos de aceite se encuentran dispersos en una matriz de hidratos de carbono y/o proteínas. También pueden considerarse aceites microencapsulados aquéllos que se encuentran en alimentos obtenidos por deshidratación de emulsiones naturales de aceite en agua, como la leche en polvo, sopas y salsas deshidratadas. La microencapsulación es una tecnología utilizada en las industrias farmacéutica y química desde hace muchos años, y fue adoptada por la industria alimentaria con los objetivos generales de proporcionar a ingredientes sólidos, líquidos o gaseosos protección, estabilización o ralentización de su liberación en el sistema digestivo (Matsuno y Adachi, 1993; Shahidi y Han, 1993; Gibbs *et al.*, 1999; Gouin, 2004; Champagne y Fustier, 2007; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kuang *et al.*, 2010; De Vos *et al.*, 2010). En el caso de los aceites, este proceso les confiere nuevas propiedades de utilidad ya que los transforma en sólidos, facilitando así su mezcla u homogeneización con los demás componentes del alimento. Además, las ventajas de la aplicación de la microencapsulación a aceites y otros sustratos lipídicos son muy diversas: proteger aceites y compuestos lipídicos de la luz y el aire, disminuir la evaporación en casos de elevada volatilidad, controlar su liberación y enmascarar o preservar aromas y sabores (Velasco *et al.*, 2000a; Madene *et al.*, 2006; Drusch y Mannino, 2009; Márquez-Ruiz *et al.*, 2010).

1.1.1.- Aceites microencapsulados: ingredientes y alimentos

La microencapsulación de aceites está dirigida fundamentalmente a la elaboración de ingredientes, aunque también existen alimentos, como las fórmulas infantiles en polvo que son *per se* aceites microencapsulados.

1.1.1.1.- Aceites esenciales

Existe una gran variedad de extractos lipídicos microencapsulados que se utilizan como aditivos aromatizantes, colorantes y saborizantes, tales como los aceites esenciales de naranja, limón, menta, especias, cebolla y ajo, y pigmentos naturales, como el caroteno (Matsuno y Adachi, 1993; Loksuwan, 2007; Bai *et al.*, 2010; Paramita *et al.*, 2010). Se adicionan a una enorme variedad de alimentos, tales como bebidas, condimentos, productos horneados (panadería, repostería), etc. La encapsulación facilita la manipulación de estos ingredientes, mejora su solubilidad y su estabilidad frente a la oxidación. En particular, la microencapsulación de aceites aromáticos es muy utilizada, fundamentalmente para retener el aroma en el producto durante su almacenamiento, minimizar las interacciones entre distintos aromas y con otros componentes del alimento, preservarlo de reacciones de oxidación, y favorecer una liberación controlada (Anandaraman y Reineccius, 1986; Madene *et al.*, 2006; Morteson *et al.*, 2010).

1.1.1.2.- Aceites ricos en ácidos grasos ω -3

Los efectos beneficiosos de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ω -3 de cadena larga (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico), mayoritarios en aceites de pescado y algas, han sido ampliamente demostrados, y destaca su papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Debido a que la ingesta mínima recomendada sólo se cumple en algunos países, existe una creciente tendencia a adicionar AGPI ω -3 de cadena larga a una gran variedad de alimentos (productos lácteos, margarinas, productos horneados, zumos, salsas, preparados dietéticos, alimentos infantiles, etc) (Garg *et al.*, 2006). La microencapsulación es una herramienta muy útil para enriquecer alimentos en AGPI ω -3 porque aumenta la protección frente a la oxidación (Shahidi, 1998; Kolanowski y Laufenberg, 2006a; Chung *et al.*, 2010). Se utiliza mayoritariamente en alimentos secos como productos de panadería, leches en polvo y alimentos infantiles y, si el producto se dispersa fácilmente en agua fría y se consigue un sabor neutro, su utilización puede extenderse a bebidas lácteas, zumos y salsas. El éxito de las aplicaciones de los ingredientes microencapsulados de aceite de pescado depende de la estabilidad oxidativa de éstos y la de los alimentos suplementados. La microencapsulación de aceites marinos se utiliza también para elaborar dietas en larvicultura (Pedroza-Islas *et al.*, 1999; Bustos *et al.*, 2003).

1.1.1.3.- Aceites ricos en ácido linoleico conjugado (CLA)

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un acrónimo que engloba a un conjunto de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico conjugado que se encuentran principalmente, de forma minoritaria, en la carne procedente de rumiantes (como resultado

de procesos de biohidrogenación en el rumen) y en los productos lácteos (0,6 -1,6 % en la composición de ácidos grasos) (Fristche *et al.*, 1999). Se han atribuido propiedades anticarcinogénicas al isómero *cis*-9, *trans*-11-ácido linoleico, que es el isómero más abundante en la naturaleza, también conocido como ácido ruménico (Masso-Welch *et al.*, 2004), y al *trans*-10, *cis*-12-ácido linoleico como responsable de la pérdida de peso y el aumento de la masa muscular (Malpuech-Bruguere *et al.*, 2004; Whigham *et al.*, 2007). Los preparados comerciales de CLA consisten en su mayoría (aprox. > 80 %) en una mezcla a partes iguales de los dos isómeros biológicamente activos (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12).

Aunque existen diferentes métodos para enriquecer los productos lácteos comerciales en CLA, el procedimiento más efectivo y más utilizado consiste en la adición directa de aceites ricos en CLA (Rodríguez-Álcala y Fontecha, 2007; García-Martínez y Márquez-Ruiz, 2009).

Sus potenciales efectos positivos para la salud, como la prevención del desarrollo de cáncer y arteriosclerosis, y la contribución a la pérdida de peso corporal, justifican su creciente utilización en suplementos dietéticos y alimentos, sobre todo en productos lácteos. Los isómeros con conocido efecto fisiológico son el ácido linoleico *cis*-9, *trans*-11 y el ácido linoleico *trans*-10, *cis*-12 (Pariza *et al.*, 2000). La encapsulación de aceites ricos en CLA, normalmente obtenidos por interesterificación de aceites ricos en ácido linoleico, se ha propuesto para aumentar su estabilidad oxidativa (Kim *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2004, 2006).

1.1.1.4.- Vitaminas liposolubles

La vitamina A (normalmente como acetato o palmitato), la vitamina E (normalmente como acetato) y la vitamina D son comercializadas frecuentemente de forma microencapsulada. La microencapsulación aumenta la estabilidad de las vitaminas liposolubles, retarda su liberación y reduce su interacción con otros componentes (Gonnet *et al.*, 2010). Así, se ha comprobado que la microencapsulación disminuye la pérdida de actividad vitamínica debida a reacciones fotoquímicas, de isomerización y de oxidación (Jackson y Lee, 1991). Es muy utilizada en productos dietéticos, alimentos infantiles, harinas de panadería, zumos y productos lácteos, especialmente los descremados.

1.1.1.5.- Leches en polvo

Las leches en polvo son ingredientes muy utilizados en la elaboración de gran variedad de alimentos, como por ejemplo el chocolate, productos horneados, alimentos infantiles e incluso son empleados en nutrición animal, debido a las excelentes propiedades nutricionales y funcionales que les confiere las proteínas del suero de la leche

y los caseinatos (Thomas *et al.*, 2004). Se obtienen normalmente por atomización de leche entera o parcialmente desnatada. El estudio de sus propiedades fisicoquímicas para mejorar su funcionalidad y estabilidad es un tema de enorme relevancia en la actualidad (Vega y Roos, 2006; Vignolles *et al.*, 2007, 2009a, b; 2010).

1.1.1.6.- Fórmulas infantiles en polvo

Las fórmulas infantiles son productos destinados a satisfacer de manera total o parcial las demandas nutritivas de los lactantes durante los primeros meses de vida, en sustitución de la leche materna. Se pueden distinguir tres grupos de fórmulas: de inicio (hasta los 6 meses), de continuación (de 4 a 6 meses) y de crecimiento (a partir del primer año de vida). La alimentación durante los primeros meses de vida tiene una influencia decisiva, no sólo en las fases tempranas del desarrollo del niño sino también en su salud a largo plazo. Por ello, la incorporación de nuevos ingredientes funcionales a las fórmulas infantiles ha dado lugar a una gran diversidad de productos. Algunos ingredientes de interés en la alimentación del lactante son los ácidos grasos poliinsaturados, oligosacáridos con efecto prebiótico, probióticos, carnitina y taurina entre otros.

Las fórmulas infantiles se encuentran en el mercado como concentrados líquidos, como preparados líquidos listos para tomar y, sobre todo, como productos en polvo. Las fórmulas infantiles en polvo, son *per se* aceites microencapsulados ya que se preparan normalmente a partir de leche de vaca que ha sido desnatada total o parcialmente y diferentes aceites vegetales, además de otros hidratos de carbono y proteínas y oligoelementos (Thompson y Kharb, 2007; Joeckel y Phillips, 2009); y posteriormente se realiza su secado para obtener el producto en polvo, siendo la atomización el método más empleado (Joeckel y Phillips, 2009; Thompson y Kharb, 2007).

Con el objetivo de aumentar la calidad nutricional y mejorar el sabor, se eliminan algunas proteínas y se adicionan diferentes hidratos de carbono, normalmente lactosa. Las proteínas más abundantemente presentes en estos productos son las derivadas de la leche de vaca como caseínas, combinaciones de caseínas y proteínas del suero o concentrados de hidrolizados de proteínas del suero. La lactosa es el componente mayoritario con un porcentaje de 35-50%. Después del proceso de atomización del preparado, la lactosa se encuentra fundamentalmente en estado amorfo. El almacenamiento debe estar controlado para evitar fenómenos no deseados como la cristalización o el colapso. Además de la lactosa, también se emplean habitualmente en las fórmulas infantiles maltodextrinas, sacarosa y jarabe de maíz como hidratos de carbono. Entre el amplio abanico de maltodextrinas disponibles, para su elección hay que llegar a un compromiso entre sus propiedades en disolución (durante la elaboración del producto) y las conferidas después del secado.

Las fórmulas infantiles contienen combinaciones de aceites y grasas adecuadas para obtener una proporción de ácidos grasos saturados e insaturados similar a la que existe en la leche materna, especialmente en ácido linoleico y α -linolénico. La leche materna contiene aproximadamente el 44% de ácidos grasos saturados, 17% de ácidos grasos poliinsaturados y 39% de ácidos grasos monoinsaturados. Actualmente, las fórmulas infantiles contienen mayor cantidad de aceites vegetales que de grasa láctea y los más utilizados son girasol alto oleico, soja, palma y oleína de palma. Una tendencia creciente es la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) porque son esenciales para el desarrollo visual y neuronal del lactante, y especialmente beneficiosos en los tres primeros meses de vida. Con este objetivo se adicionan aceites de pescado o aceites derivados de microalgas, como fuentes de 20:4 ω -6 (ácido araquidónico, AA) y 22:6 ω -3 (ácido docosahexaenoico, DHA).

Las interacciones entre los componentes de las fórmulas infantiles y las modificaciones químicas que pueden ocurrir durante su preparación y conservación son muy importantes para mantener su calidad nutricional (Nasirpour *et al.*, 2006).

1.1.2.- Preparación de aceites microencapsulados

De forma resumida, la microencapsulación de aceites consiste en la preparación de una emulsión de aceite en agua, conteniendo las proteínas y/o hidratos de carbono que constituirán la matriz encapsulante, y su posterior secado, normalmente por atomización, cuyo resultado es un producto en polvo. Existen numerosos métodos para la preparación de aceites microencapsulados, cuya selección depende de su coste, sensibilidad del aceite, tamaño de partícula deseado, propiedades físicas y químicas de los componentes, y aplicaciones.

1.1.2.1.- Matriz encapsulante

Las propiedades ideales de la matriz de encapsulación o agente encapsulante incluyen la facilidad de manipulación durante el proceso de encapsulación, capacidad de dispersar o emulsificar el aceite y de estabilizar la emulsión producida, nula reactividad con el aceite, capacidad de proporcionar máxima protección frente a las condiciones ambientales, solubilidad en los disolventes aceptados en la industria alimentaria y coste correspondiente a una sustancia de uso alimentario. Resulta prácticamente imposible que una sustancia reúna todas las propiedades deseadas así que en la práctica se utilizan frecuentemente combinaciones de materiales (Shahidi y Han, 1993; Vega y Roos, 2006). Los agentes encapsulantes más comunes son hidratos de carbono y proteínas.

- Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son los agentes encapsulantes más utilizados, especialmente por su capacidad de retener volátiles. Entre ellos, cabe destacar la lactosa, muy utilizada en atomización por su sabor y olor neutros, alta solubilidad y baja viscosidad, aunque su precristalización puede ser necesaria para evitar problemas asociados con la higroscopicidad y plastificación de la lactosa amorfa (Vega y Roos, 2006). Se usa normalmente en combinación con proteínas de la leche.

Las ciclodextrinas son moléculas cíclicas de 6 (α -), 7 (β -) u 8 (γ -) monómeros de glucosa, derivadas enzimáticamente del almidón, que poseen la capacidad de formar complejos de inclusión. Dichos monómeros forman un anillo, proporcionando una estructura relativamente rígida con una cavidad de diámetro y volumen específico. Mientras que la superficie externa es de naturaleza hidrofílica, la cavidad interna posee una densidad electrónica relativamente alta y es hidrofóbica, y ello permite la interacción por enlaces no covalentes con moléculas de determinado tamaño, forma e hidrofobicidad, especialmente especias, extractos aromáticos y pigmentos naturales como los carotenoides (Bai *et al.*, 2010).

Por otra parte, la sacarosa es sin duda el azúcar más utilizado en la industria alimentaria y es muy eficiente para encapsular volátiles. Sin embargo, no se utiliza sola sino en combinación con lactosa o hidratos de carbono de elevado peso molecular como las maltodextrinas y el almidón natural o modificado.

Las maltodextrinas son productos de hidrólisis del almidón con equivalente de dextrosa inferior a 20. A pesar de su pobre poder emulsionante son muy utilizadas, frecuentemente en combinación con goma arábica porque al ser compuestos de muy diferente peso molecular (1800 - 1700000), favorecen conjuntamente la continuidad estructural durante la formación de la película encapsulante, mejorando con ello la eficiencia de encapsulación de aceites. Sin embargo, esto depende del grado de hidrólisis de las maltodextrinas ya que si el equivalente de dextrosa es muy bajo no tienen el efecto positivo mencionado (Lumdubwong, 2001).

El jarabe de almidón de maíz está constituido por productos de hidrólisis del almidón con equivalente de dextrosa superior a 20. Además de éste y otros tipos de almidón hidrolizado, se utilizan también almidones modificados o derivatizados. Por ejemplo, se está utilizando actualmente un nuevo derivado de almidón (*n*-octenilsuccinato) obtenido por derivatización del ácido succínico octenil sustituido (alquenil ácido dicarboxílico) con almidón en medio básico (Drusch *et al.*, 2007; Serfert *et al.*, 2010).

Las gomas son usadas para modificar la textura de determinados alimentos y, como efectos secundarios, encapsulan, estabilizan la emulsión y controlan la cristalización. Históricamente, la goma arábica constituye el agente encapsulante más utilizado en microencapsulación de aceites, por su versatilidad, solubilidad, baja viscosidad y excelentes propiedades emulsificantes. Está compuesta de azúcares simples en una estructura altamente ramificada y contiene un 2 % de proteína. Se ha demostrado que la goma arábica se adsorbe en la interfase aceite/agua formando una película viscoelástica, donde los lípidos contribuyen a aumentar la coherencia de la estructura a través de la formación de uniones con las cadenas de la goma arábica (Matsumara *et al.*, 2000). El pH puede afectar a la goma arábica alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que puede conducir a modificaciones en la permeabilidad de la matriz que forman, en la eficacia de encapsulación y de retención de los aceites. La naturaleza del polímero también tiene efecto sobre estas propiedades (Pedroza-Islas *et al.*, 1999).

Una de las propiedades más importantes de los hidratos de carbono como agentes encapsulantes es la temperatura de transición vítrea (T_g) ya que determina la cohesividad y movilidad molecular de la matriz que constituyen, como se comentará en el apartado 1.1.4.4.

Los éteres de celulosa, especialmente la hidroxipropilmetilcelulosa y la carboximetilcelulosa, se usan frecuentemente como matriz hidrofílica de liberación controlada. Están disponibles en un amplio rango de pesos moleculares y se clasifican según su viscosidad (Ishikawa *et al.*, 2000).

- Proteínas

Las proteínas son importantes agentes encapsulantes debido a sus propiedades emulsificantes, espumantes, de hidratación, gelificación y retención de aceites y aromas. Su conformación espacial depende del pH y la fuerza iónica. Las propiedades funcionales de las proteínas se ven modificadas por la desnaturalización que puede ocurrir por efecto del proceso de secado, aun utilizando tratamientos térmicos de corta exposición como el secado por atomización. En consecuencia, se forma una estructura de gel por la agregación entre proteínas debido a la exposición de sus grupos hidrofóbicos.

Las proteínas de la leche son muy valoradas como ingredientes alimentarios tanto en sus formas solubles como dispersas. Las principales proteínas de la leche son las caseínas y las proteínas del suero de la leche (Augustin *et al.*, 2010). Las caseínas y caseinatos poseen propiedades tensioactivas que los convierten en agentes encapsulantes de alto poder emulsificante, y entre ellos el caseinato sódico destaca como el más utilizado (Vega y Roos, 2006; Rocha-Guzman *et al.*, 2010). Existen 4 tipos de

caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), que constituyen aproximadamente el 38, 10, 36 y 12 % de la fracción caseínica, y todas contienen un alto nivel de prolina, que evita la formación de estructuras secundarias haciéndolas así más estables frente a la desnaturalización y contribuye a su elevada actividad tensioactiva, y de ahí su capacidad espumante y emulsificante. Otro tipo de proteínas lácteas, las aisladas del suero de leche, se han venido utilizando para la microencapsulación de aceites por su baja viscosidad y alta capacidad emulsificante (Young *et al.*, 1993a, b). Esta fracción contiene 4 proteínas mayoritarias: β -lactoglobulina (50 %), α -lactoalbúmina (20 %), albúmina del suero bovino (10 %) e inmunoglobulina (10 %). La principal desventaja como encapsulante es su susceptibilidad a la desnaturalización y sus efectos en el tamaño de glóbulo de aceite de la emulsión antes del secado por atomización. Pueden utilizarse como aislados o concentrados, solas o combinadas con hidratos de carbono o con caseinatos.

La gelatina es una proteína hidrosoluble derivada del colágeno, con características fisicoquímicas muy adecuadas para la microencapsulación (Shahidi y Han, 1993). Sus soluciones acuosas forman geles y exhibe efectos policatiónicos o polianiónicos dependiendo del pH. Se utiliza normalmente en combinación con sacarosa, gomas o maltodextrinas.

1.1.2.2.- Técnicas de microencapsulación

Existen numerosas técnicas para la preparación de microencapsulados, de hecho se han encontrado más de 200 métodos patentados (Magdassi y Vinetsky, 1996; Brazel, 1999; Jyothi *et al.*, 2010). Entre los métodos químicos pueden citarse la coacervación compleja, la polimerización interfacial, la gelificación iónica, la incompatibilidad polimérica y la formación de liposomas (Gibbs *et al.*, 1999) y entre los métodos físicos destacan el secado por atomización, liofilización, extrusión y la encapsulación por lecho fluidificado (Shahidi y Han, 1993). La selección del método depende de numerosos factores que incluyen el coste, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y los mecanismos de liberación. En el caso de los aceites microencapsulados, destacan los siguientes métodos de secado:

- La atomización es el proceso más económico y flexible y, por tanto, el más utilizado (Gharsallaoui *et al.*, 2007). El proceso consiste en la preparación de una dispersión o emulsión, su homogeneización y desecación en atomizadores industriales mediante nebulización y utilizando una corriente de aire caliente. Los parámetros de homogeneización (presión, temperatura) y atomización (temperatura, grado de nebulización, contenido en sólidos) tienen gran influencia sobre el tamaño de las partículas y el rendimiento de encapsulación. La evaporación del agua se realiza a temperatura elevada (entre 150 y 300 °C) durante segundos. Los ingredientes resultantes se

caracterizan por un tamaño de partícula pequeño (generalmente con diámetro inferior a 50 μm) que los hace muy solubles, pero pueden presentar problemas de separación en mezclas secas. Una modificación de esta técnica más apropiada para sustancias muy volátiles o termolábiles consiste en el uso de aire a temperatura ambiente o refrigerado para evaporar el disolvente.

- La liofilización es el método más apropiado para la desecación de casi todos los materiales sensibles al calor y aromatizantes, debido a la baja temperatura del proceso. Aun cuando el periodo de desecación es largo (aproximadamente 20 horas), el método es simple y suave ya que todo el proceso se realiza a baja temperatura y baja presión (condiciones de sublimación del hielo). Es muy utilizado para encapsular aceites aromáticos y pigmentos.

- La extrusión consiste en forzar el material a encapsular disperso en una masa de hidratos de carbono a través de orificios hasta un baño de líquido frío desecante, como isopropanol o nitrógeno líquido, que permite la solidificación. Los filamentos extrusionados son posteriormente secados y molidos. Los productos basados en almidón son a menudo extrusionados para descomponer los gránulos de almidón y hacerlo así más digerible y para obtener un producto con una forma definida. La encapsulación de saborizantes y medicamentos es otra aplicación muy frecuente del procedimiento de extrusión. Con este método no es necesario un material plastificador como el agua.

- La cocrystalización utiliza sacarosa y consiste en su cristalización espontánea a partir de una solución sobresaturada, formando así agregados de cristales de 3 a 30 μm que encapsulan el material deseado. Es un método relativamente simple y muy económico.

- La coacervación es una técnica muy eficiente pero costosa. Consiste en tres etapas: en primer lugar, se mezclan el material a encapsular, el material de cobertura y la fase continua constituyendo un sistema de tres fases; después mediante cambio de pH o de temperatura el material de cobertura se deposita en la superficie del material activo originando una separación de fases entre el material encapsulado y la fase continua; y finalmente, se solidifica la cobertura por temperatura, polimerización, etc.

- La inclusión molecular utiliza fundamentalmente β -ciclodextrina como medio de encapsulación. La β -ciclodextrina es un oligómero cíclico de glucosa, que consta de siete unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α ($1 \rightarrow 4$). Su solubilidad es limitada y posee una cavidad central hidrofóbica y una superficie externa relativamente hidrofílica. Los complejos de inclusión se forman con compuestos menos polares que el agua, tales como sustancias aromáticas, cuya dimensión sea similar a la de la cavidad central. La

disponibilidad de las ciclodextrinas ha aumentado en los últimos años debido al desarrollo de métodos económicos para su producción.

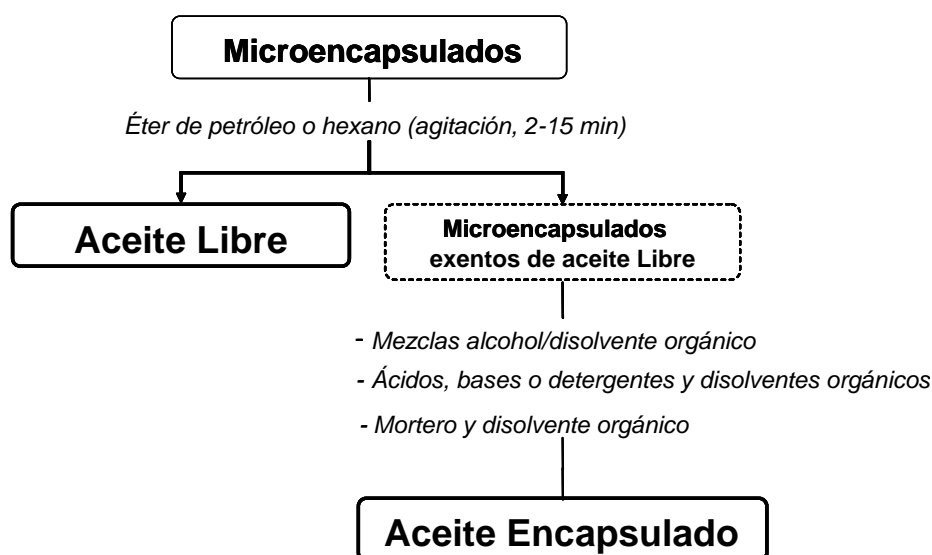
1.1.3.- Características físicoquímicas de los aceites microencapsulados

1.1.3.1.- Distribución del aceite

Una característica de gran importancia en los aceites microencapsulados es la distribución del aceite en la matriz de encapsulación. Se considera normalmente la existencia de dos fracciones lipídicas: fracción de aceite no encapsulado o libre y la fracción de aceite encapsulado. La definición de aceite libre generalmente aceptada establece que es la fracción de aceite extraída mediante lavado con disolventes orgánicos sin disrupción de la matriz (Buma *et al.*, 1971a). El aceite así extraído se encuentra tanto en la superficie de la partícula como en el interior, en los poros y las cavidades que se forman en el procedimiento de secado. En la mayoría de los estudios donde se determina el contenido de aceite libre, se utiliza la determinación propuesta por Buma (1971a, b). La extracción de esta fracción consiste en un lavado con disolventes no polares bajo condiciones estandarizadas. Normalmente se emplean tiempos de agitación entre 10-15 minutos, los disolventes más utilizados son el éter de petróleo y hexano y se utilizan diferentes proporciones de disolvente:microencapsulado (Young *et al.*, 1993a, Hogan *et al.*, 2001a, Kim *et al.*, 2002, Vega *et al.*, 2005). Buma observó que la influencia del disolvente elegido y su proporción con la muestra no son factores de gran importancia pero sí el tiempo de contacto con el disolvente y la temperatura, aunque depende del tipo de muestra, existiendo una elevada correlación entre la porosidad de la partícula y el aceite libre (Buma, 1971a,b).

Fäldt y Bergenstahl introdujeron un nuevo método, la espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA) para determinar el aceite en la superficie de las partículas, al que denominaron aceite superficial, mediante el cual se identifican elementos químicos presentes en superficies sólidas. Los electrones son emitidos por la muestra en la región superficial (10 nm de profundidad) y las concentraciones atómicas relativas de los elementos C, O y N se cuantifican a partir de factores de sensibilidad. Las proporciones de los elementos se asumen como una combinación lineal de los que existen en los componentes puros (proteínas, lípidos e hidratos de carbono) de la muestra. Utilizando esta relación en una fórmula matricial se calcula el porcentaje de cobertura de los distintos componentes en la superficie de la muestra, pero su relación con el aceite determinado como libre con disolventes orgánicos no ha sido claramente establecida (Fäldt y Bergenstahl, 1994, 1995, 1996).

Para calcular la eficacia de encapsulación (cantidad de aceite encapsulado con respecto a la cantidad total de aceite) es necesario además extraer cuantitativamente la fracción de aceite encapsulado o bien el aceite total. En la **Figura 1.1** se representa esquemáticamente el procedimiento a seguir si una vez obtenido el aceite libre, es de interés extraer seguidamente el aceite encapsulado en la misma muestra. Dependiendo de las características de la matriz, se realizan extracciones con mezclas de alcohol y disolvente orgánico (método de Folch o sus modificaciones) (Folch *et al.*, 1957) o la utilización de ácidos, bases o detergentes previamente a la extracción con disolventes orgánicos, en el caso de matrices más difíciles de disgregar. Otra opción es la ruptura mecánica (física) de la matriz mediante, por ejemplo, mortero y pistilo, para liberar el aceite encapsulado seguido de una extracción con disolventes orgánicos.



$$\text{Eficacia de encapsulación (\%)} = (\text{Aceite Encapsulado} / \text{Aceite Total}) \times 100$$

Figura 1.1. Representación esquemática de la extracción diferenciada de las fracciones superficial y encapsulada de aceites microencapsulados y cálculo de la eficacia de encapsulación.

La eficacia de encapsulación depende de muchas de las variables que intervienen en la preparación de aceites microencapsulados y numerosos estudios se han llevado a cabo para evaluar la influencia del tipo y concentración de agentes encapsulantes, y de la relación lípidos:matriz y condiciones de secado en la eficacia de encapsulación (Velasco *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2010; Jyothi *et al.*, 2010; Márquez-Ruiz *et al.*, 2010; Vignolles *et al.*, 2010). Aunque los resultados son muy variables y difíciles de comparar por la enorme variabilidad de las condiciones de los experimentos, puede deducirse que entre los agentes con mayor capacidad de encapsulación se encuentran la combinación de lactosa y caseinatos (Vega y Roos, 2006) y que la atomización generalmente conduce a elevados valores de eficacia de encapsulación (Shahidi y Han, 1993).

Existen interesantes estudios sobre leches en polvo obtenidas por atomización que evalúan la influencia del tipo y concentración de los componentes de la leche (Kelly *et al.*, 2002) y además resaltan la importancia de la relación proteína-lactosa (Young *et al.*, 1993 a,b; Rosenberg y Young, 1993). Otros estudios enfocados a los componentes de la leche, utilizando caseinato sódico o proteínas del suero y lactosa para encapsular aceite de soja, han mostrado que la lactosa aumenta la eficacia de encapsulación cuando se utiliza caseinato sódico (Fäldt y Bergenstahl, 1995).

En particular, el aumento de la eficacia de encapsulación es el objetivo primordial en el contexto de las sustancias aromáticas, ya que es crítico seleccionar matrices con gran capacidad de retención de las esencias, pigmentos o sustancias volátiles. En el proceso de atomización, se ha demostrado que una alta concentración de sólidos en la emulsión previa aumenta la retención de volátiles (Rosenberg *et al.*, 1990; Sheu y Rosenberg, 1995). La influencia del contenido en sólidos y aceite en la eficacia de encapsulación es uno de los parámetros más estudiados (McNamee *et al.*, 1998; Pauletti y Amestoy, 1999). Entre los agentes encapsulantes más efectivos destacan el caseinato sódico para la retención de caroteno (Dian *et al.*, 1996) y para la retención del aceite de naranja (Kim y Morr, 1996; Kim *et al.*, 1996), las gomas (Bangs y Reineccius, 1990) y la β -ciclodextrina para el aceite de limón (Bhandari *et al.*, 1998) y aceite de ajo (Bai *et al.*, 2010).

En aromas, actualmente es frecuente el uso de la doble encapsulación usando una grasa vegetal (Cho y Park, 2002) o la formación de aglomerados utilizando o no un componente adicional que presente mayor tamaño de partícula, ya que así se consigue aumentar la eficacia de encapsulación y mejorar la disolución o dispersión en líquidos (Buffo *et al.*, 2002).

En cuanto al proceso de liofilización, utilizado frecuentemente para la microencapsulación de sustancias volátiles, se han ensayado diferentes hidratos de carbono como la glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y dextran-10 (Flink y Karel, 1970a).

Concretamente para aromas cítricos, se ha indicado la efectividad de las combinaciones de maltodextrina y sacarosa (Kopelman *et al.*, 1977). Respecto a los efectos de las variables del proceso de liofilización en la eficacia de retención de volátiles, se ha demostrado que ésta aumenta a medida que aumenta la velocidad de secado y disminuye la velocidad de congelación (Flink y Karel, 1970b; Rulkens y Thijssen, 1972; Menting *et al.*, 1970).

1.1.3.2.- Tamaño de glóbulo de aceite

El tamaño de glóbulo de aceite encapsulado depende de la composición de la matriz, las condiciones de homogeneización de la emulsión y del procedimiento utilizado para el secado. Los principales trabajos que analizan este parámetro son estudios de leches en polvo (Vega y Roos, 2006; Vignolles *et al.*, 2007, 2009a,b) y de aceites microencapsulados con matriz láctea y secados por atomización (Fäldt y Bergenstahl, 1996; Keogh *et al.*, 1999, 2001; Soottitanwat *et al.*, 2003) y, en menor proporción, de aceites microencapsulados con otras matrices (Kim *et al.*, 1996; McNamee *et al.*, 1998; Kagami *et al.*, 2003; Drusch *et al.*, 2007). Las conclusiones generales más aceptadas en muestras atomizadas son las siguientes:

- Si el emulsionante es efectivo, las condiciones de homogeneización de la emulsión determinan el tamaño de glóbulo en el aceite microencapsulado, de forma que se obtienen generalmente menores tamaños de glóbulo a mayores presiones. Así mismo, el aumento del número de pases de homogeneización contribuye a disminuir el tamaño de glóbulo y la dispersión de tamaños de glóbulos.

- Las propiedades de la matriz influyen en la emulsificación del aceite y, por tanto, en el tamaño y distribución de tamaños de los glóbulos tras el secado.

- La relación aceite:matriz puede afectar al tamaño de glóbulo cuando supera la capacidad de esta última para formar emulsiones estables.

Por otra parte, no se han encontrado trabajos previos sobre la influencia del procedimiento de secado en el tamaño de glóbulos, a igualdad de otros parámetros, así como del efecto de la presión de homogeneización y la matriz utilizada en muestras secadas por métodos distintos a la atomización.

Una de las técnicas más utilizadas para la determinación del tamaño de glóbulos es la técnica de difracción láser que se basa en la interacción de las partículas con un haz de luz láser. Los glóbulos dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. Los analizadores de tamaños de partícula por difracción láser están basados en que el patrón de dispersión creado por el conjunto de

partículas es igual a la suma de los patrones de dispersión individuales de todas las partículas presentes. Conociendo la disposición geométrica de los detectores de un instrumento y de la fuente de luz y los datos que representan las intensidades relativas de la luz dispersada recibida se puede calcular la distribución de tamaños de partículas.

1.1.3.3.- Actividad de agua

El término “actividad de agua” (a_w) está relacionado con la intensidad con la que el agua se asocia a los diferentes componentes no acuosos. El agua implicada en asociaciones fuertes es menos susceptible a intervenir en las reacciones químicas que el agua débilmente asociada. La a_w se expresa como el cociente entre la presión de vapor de agua ejercida por el agua presente en un alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. La humedad relativa (HR) y a_w en el equilibrio y a una temperatura dada son dos magnitudes directamente proporcionales relacionadas por la siguiente ecuación: $a_w = \text{HR} (\%)/100$. En el equilibrio hay equivalencia entre la HR ambiente y la a_w de un alimento sometido a esa atmósfera de humedad. Por otra parte, la relación existente entre la cantidad de agua retenida por un alimento y la HR ambiente, en el equilibrio y a temperatura constante, se recoge en las denominadas isothermas de adsorción. Así, las isothermas de adsorción permiten prever la influencia de las variaciones de humedad relativa ambiente sobre el contenido en agua, indicando la higroscopicidad del producto. En las curvas de adsorción se pueden distinguir dos zonas: una, en la cual la a_w está comprendida entre 0 y aproximadamente 0,3, donde el agua se encuentra fuertemente ligada; y otra, a a_w superiores, correspondiente a la zona del agua débilmente ligada.

Son pocos los trabajos encontrados donde se haya determinado la a_w inicial de las aceites microencapsulados (Kelly *et al.*, 2002; Drusch *et al.*, 2006c, Vignolles *et al.*, 2009a). La mayoría de los trabajos equilibran las muestras con soluciones salinas saturadas para alcanzar valores de a_w deseados para su conservación (Chuy y Labuza, 1994, Roos *et al.*, 1991, Hardas *et al.*, 2002). Algunos trabajos relacionan la a_w con el contenido de agua en la muestra durante el almacenamiento para ver cambios estructurales de la matriz, como el colapso o la cristalización de la lactosa, la cual provoca una disminución drástica del contenido de humedad en la muestra a altos valores de a_w . Saltmarch y Labuza estudiaron el efecto de la HR en el estado físico de la lactosa en aceites microencapsulados en matriz de proteínas del suero de la leche y lactosa (1980), mientras que Labrousse y colaboradores lo estudiaron en linoleato de metilo encapsulado con diferentes matrices de hidratos de carbono (lactosa, maltodextrina y sacarosa) y gelatina (1992), y Chuy y Labuza en fórmulas infantiles en polvo durante su conservación a diferentes valores de a_w (1994). Recientemente Jiménez y colaboradores estudiaron el efecto de la a_w en las propiedades físicas de microencapsulados de ácido linoleico

conjugado en diferentes matrices, concluyendo que a $a_w < 0,5$ las condiciones de conservación fueron las más idóneas (2010). Como se comentará posteriormente, existe una estrecha relación entre la a_w y la temperatura de transición vítrea. Esta última debe ser superior a la temperatura de almacenamiento de los aceites microencapsulados para evitar cambios estructurales en la matriz encapsulante y otras reacciones no deseadas relacionadas con el aumento de la movilidad molecular de la estructura.

Existen muchos métodos para determinar la a_w en alimentos en polvo, como los aceites microencapsulados, que incluyen las isotermas de sorción de humedad, la medida de la depresión del punto de congelación, con ayuda de psicrómetros, higrómetros de punto de rocío, o la medida de la constante dieléctrica de un material poroso. La utilización de estos últimos proporciona una medida fiable, sencilla y rápida.

1.1.3.4.- Temperatura de transición vítrea (Tg)

La temperatura de transición vítrea es la temperatura que marca la diferencia entre dos estados físicos de los sólidos amorfos. En los aceites microencapsulados, a temperaturas superiores a la Tg la matriz polimérica en la que se encuentran inmersos los lípidos se encuentra en un estado gomoso (“rubbery”, en inglés) donde existe elevada movilidad molecular del medio sólido y se produce una disminución de la viscosidad y de la rigidez. Sin embargo, a temperaturas inferiores a la Tg, la estructura de la matriz es rígida, con menos espacio libre, por lo tanto se encuentra formando una estructura encapsulante con gran cohesividad, donde la movilidad molecular es casi nula, y este estado es denominado vítreo (“glassy” en inglés). Se ha determinado que la transición vítrea corresponde a una zona de temperatura donde la viscosidad alcanza valores de 10^{10} – 10^{12} Pa.s.

La determinación de la Tg en los aceites microencapsulados y en los alimentos en general no resulta fácil debido a la heterogeneidad de su composición. El estudio de sus componentes por separado permite averiguar la relación entre la temperatura y el contenido de agua para el cual las propiedades físicas pueden variar con la temperatura (Champion *et al.*, 2000). La Tg de los hidratos de carbono más utilizados en la preparación de microencapsulados como la lactosa, sacarosa, maltodextrinas y sus mezclas ha sido estudiada ampliamente (Roos y Karel, 1991, Liu *et al.*, 2006). Las matrices constituidas por moléculas de alto peso molecular (como los polisacáridos) conllevan un incremento de la viscosidad, y, por tanto, la necesidad de temperaturas más altas para que ocurra la transición del estado vítreo al gomoso, es decir Tg más elevadas (Thomas *et al.*, 2004).

La mayoría de los trabajos publicados sobre Tg en aceites microencapsulados se han realizado en productos atomizados, principalmente en leches en polvo (Jouppila *et al.*,

1997, Roos, 2002, Thomas *et al.*, 2004; Silalai y Roos, 2010) aunque existen algunos trabajos en muestras liofilizadas (Roos y Karel, 1991).

El aumento de la actividad de agua conduce a una disminución de la Tg (Roos y Karel, 1991; Grattard *et al.*, 2002). Se ha demostrado que es una relación lineal para actividades de agua en el rango 0,1-0,3 en leches en polvo (Vuataz, 2002). Por ejemplo, para la lactosa con contenidos de humedad (g de agua/100 g sólidos) de 0, 1 y 4 %, la Tg es de 100, 70 y 45 °C, respectivamente (Fritsch, 1994). En consecuencia, la determinación de la Tg en los aceites microencapsulados es importante para la elección de la temperatura de conservación. Normalmente se utilizan matrices con altas Tg para garantizar que permanezcan en el estado vítreo durante el almacenamiento (Orlien *et al.*, 2000).

La Tg puede determinarse con diferentes métodos que miden los cambios de las propiedades físicas de la matriz pero el más utilizado es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), que se basa en la medida de cambios en la capacidad calorífica.

1.1.3.5.- Densidad

Se pueden diferenciar dos tipos de densidades en los productos en polvo: densidad real y densidad aparente.

La densidad real o absoluta se refiere al peso de las partículas de un volumen determinado de polvo. La determinación de la densidad real más empleada se realiza mediante picnometría de gases con He. Esta técnica se basa en el principio de Arquímedes de desplazamiento de fluidos y la ley de Boyle de expansión de gases. En este caso el fluido desplazado es un gas, debido a las pequeñas dimensiones atómicas del He la penetración en los poros más finos, se encuentra prácticamente asegurada.

La densidad aparente o en “bulk” de un polvo es igual a la relación entre su masa y el volumen que ocupa. En función del empaquetamiento al que sean sometidos los productos en polvo, tales como los aceites microencapsulados, la densidad puede variar. Es decir, la densidad en “bulk” puede ser a su vez aireada o empaquetada (Abdullah y Geldart, 1999). La densidad aireada se mide sin ejercer ninguna fuerza o manipulación sobre el polvo. Simplemente se deposita en un contenedor por acción de la gravedad y se mide el volumen que ocupa. Para calcular la densidad empaquetada, se golpea el contenedor donde se encuentra el aceite microencapsulado aireado y se mide el volumen ocupado. Existen equipos específicos para medir estos dos tipos de densidades, pero también puede realizarse de un modo sencillo mediante medidas de volumen con ayuda de probetas. Conocidos ambos tipos de densidades es posible calcular tanto el contenido de aire intersticial como la compresibilidad (Kagami *et al.*, 2003).

Drusch y colaboradores determinaron la densidad verdadera y aparente en aceites de pescado microencapsulado y concluyeron que la relación entre los componentes de la matriz y las condiciones del procedimiento de secado (atomización) influyen considerablemente en la densidad. Con mayores contenidos en sólidos disminuyeron significativamente ambos tipos de densidades posiblemente por un aumento de la inclusión de aire. Por otra parte, con altas temperaturas de entrada de aire en el atomizador se obtuvieron polvos con densidades menores, probablemente debido al rápido secado a esas temperaturas más altas (Drusch *et al.*, 2006a). La disminución de la densidad aparente está también asociada con una mayor inclusión de aire en la emulsión previa, que conlleva a un aumento en la porosidad de las partículas (Dijkink *et al.*, 2007, Drusch *et al.*, 2007).

1.1.3.6.- Color

La medida del color permite observar diferencias debidas a la composición de las matrices y de los aceites empleados. Además, resulta de utilidad durante el almacenamiento de los aceites microencapsulados porque diferentes reacciones como la oxidación, reacciones de Maillard, etc., conducen a cambios de color. Por ello, se han publicado trabajos donde se estudia el cambio del color en aceites de pescado microencapsulados (Drusch *et al.*, 2006b, c) y sobre todo en leches en polvo (Celestino *et al.*, 1997, Nielsen *et al.*, 1997, Stapelfeldt *et al.*, 1997).

La determinación del color se realiza mediante un espectrofotómetro, seleccionando la longitud de onda del visible (400 a 780 nm) y con medidas de reflectancia o transmitancia. Existen diferentes espacios de color e iluminantes y en función de ellos se obtienen las coordenadas de cromaticidad. El valor de medición varía dependiendo de la densidad del polvo y de las condiciones de la superficie.

1.1.3.7.- Solubilidad en agua

Es la capacidad de una sustancia de disolverse en otra. La solubilidad de una sustancia depende de la naturaleza del disolvente y del soluto, así como de la temperatura y la presión del sistema, es decir, de la tendencia del sistema a alcanzar el valor máximo de entropía. La encapsulación de los aceites mejora su solubilidad, lo que es fundamental para su adición a diferentes productos como bebidas, zumos o preparados lácteos. Como es bien conocido, el carácter polar o apolar del soluto influye en su solubilidad en el disolvente. Por tanto, es de esperar que las matrices más polares se disuelvan más fácilmente en disoluciones acuosas.

Entre los métodos que existen para determinar la solubilidad de los productos en polvo en agua, uno de los más utilizados es el índice de solubilidad. El producto en polvo

se dispersa en agua, y a continuación se somete a un proceso de centrifugación bajo unas condiciones específicas. Este índice mide el volumen de sedimentos originados después de la centrifugación (Thomas *et al.*, 2004).

1.1.3.8.- Tamaño de las partículas de polvo

El tamaño promedio de las partículas de los aceites microencapsulados es muy variable y depende principalmente del método de secado empleado.

Las partículas de microencapsulados obtenidos mediante atomización varían en la forma y el tamaño en función de la temperatura, del tipo de atomizador y de la concentración y tipo de matriz utilizada. En atomizadores de disco rotatorio la velocidad del disco juega un importante papel en el tamaño de partículas. Por ejemplo, se ha descrito que velocidades de alrededor de 10 000 r.p.m. proporcionan tamaños en el rango de 60-70 μm , y velocidades de aproximadamente 30 000 r.p.m. tamaños de partícula entre 25 y 30 μm . El tamaño de partícula también se puede regular con el flujo de la emulsión de alimentación. Con la misma velocidad de disco un flujo alto proporciona partículas de mayor tamaño que un flujo menor. Es bien aceptado que, en general, temperaturas altas de secado favorecen una rápida formación de la pared, lo que conlleva que se formen partículas de gran tamaño. Grandes tamaños de partícula tienen una menor relación superficie/volumen y por lo tanto pueden encapsular mayor cantidad de aceite. Sin embargo, la formación de partículas de gran tamaño conlleva más tiempo pudiendo producirse pérdidas de sustancias volátiles (Beristain *et al.*, 2001) . El tamaño de partícula aumenta en una relación no lineal con el contenido total de solutos en la emulsión, y muestra una buena correlación con la viscosidad de la emulsión. También es posible que el aumento de aglomeraciones entre las partículas de microencapsulados obtenidos por atomización, debido a la presencia de aceite superficial, contribuya a los grandes tamaños de partícula aparentes que se observan cuando se aumenta la relación entre aceite y proteína (Hogan *et al.*, 2001a; Shen *et al.*, 2010).

En atomizadores de presión, el tamaño de partícula disminuye con el diámetro de la boquilla de dispersión (Elversson *et al.*, 2005). Además, la forma de las partículas está influida por la susceptibilidad a la cristalización de los hidratos de carbono de la matriz, de ahí que azúcares en estado amorfo como la lactosa o la sacarosa formen a menudo partículas con hoyos y, en cambio, las partículas con hidratos de carbono en estado cristalino como el manitol, sean porosas (Elversson *et al.*, 2005).

Para determinar el tamaño promedio y la distribución de tamaños las partículas se dispone métodos directos mediante los cuales se separan las partículas en fracciones por tamaño o por peso referente a una escala. También existen métodos indirectos, como por

ejemplo basados en la medición de una propiedad física (volumen equivalente, volumen de sedimentación, masa, densidad, viscosidad, adsorción, etc.) relacionada con el tamaño de las partículas. Cabe destacar entre los métodos indirectos la utilización de la técnica de difracción láser para calcular la distribución en función del volumen. Entre los métodos directos se encuentran el método de retención por tamices y la observación al microscopio.

1.1.3.9.- Viscosidad

La viscosidad de las emulsiones de partida para la preparación de los aceites microencapsulados se ve afectada por varios factores como el contenido de sólidos y el grado de homogeneización, entre otros. El procedimiento de homogeneización, provoca la disminución del tamaño de glóbulo del aceite, aumentando así el número de glóbulos y por tanto el área interfacial. La presencia de numerosos glóbulos de aceites puede provocar fenómenos no deseados como coalescencia y aglomeración, incrementando así la viscosidad.

En el secado mediante atomización, la viscosidad de la emulsión en la alimentación es importante porque afecta al tamaño de partícula y al espesor de las paredes, ya que cuanto mayor sea la viscosidad mayor será el tiempo necesario para la formación de las gotas generando partículas más grandes, como se ha comentado en el punto anterior (Kim *et al.*, 1996).

La viscosidad de las emulsiones se mide con un viscosímetro y la de los productos microencapsulados mediante un reómetro.

1.1.4.10.- Porosidad

Es uno de los factores intrínsecos de las partículas que viene definido por las propiedades de la matriz y las condiciones de secado.

La porosidad influye en la extracción de la fracción de aceite libre de los aceites microencapsulados porque afecta a la accesibilidad del disolvente (Buma, 1971a, b). De Vilder y colaboradores encontraron una correlación lineal positiva entre el contenido de aceite libre y la penetración de nitrógeno como medida de la porosidad de la partícula (De Vilder *et al.*, 1976). En los productos microencapsulados la porosidad es importante en el fenómeno de la oxidación, ya que cuanto más porosa sea la matriz más fácilmente se difundirá el oxígeno, pudiendo así alcanzar el interior de la partícula del microencapsulado (Drusch *et al.*, 2006a).

Existen diferentes métodos para medir la porosidad pero uno de los más utilizados es la medida a través de la expansión de un gas.

1.2.- OXIDACIÓN LIPÍDICA. AUTOXIDACIÓN

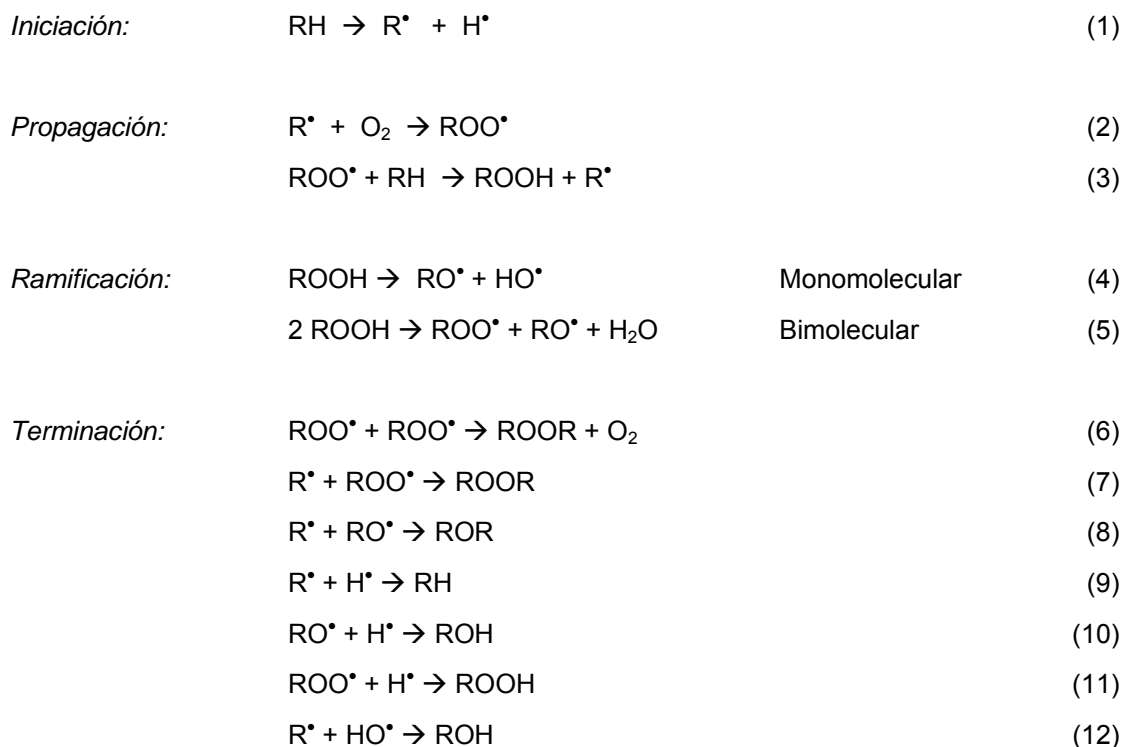
En este apartado se resumen las características generales de la oxidación lipídica, incluyendo una breve descripción del proceso de autooxidación -el mecanismo principal de oxidación en los lípidos de alimentos-, de los compuestos de oxidación formados, de las variables de mayor relevancia que intervienen en el proceso y de los métodos más utilizados para la evaluación de la oxidación, especificando los aplicados en estudios de aceites microencapsulados.

Los lípidos se oxidan a través de una complicada serie de reacciones que da lugar a numerosos compuestos no volátiles y volátiles. La oxidación lipídica constituye una de las mayores causas de deterioro de la calidad tanto en alimentos naturales como procesados. No sólo afecta a la calidad del alimento por la aparición de la rancidez y el deterioro de sabores y aromas, sino también por la pérdida de nutrientes esenciales como ácidos grasos esenciales y vitaminas. Además, como consecuencia de la reacción de los lípidos oxidados con otros componentes del alimento se pueden producir cambios en la textura y en el color. La oxidación lipídica puede tener lugar en cualquier estadio de la preparación, procesamiento y conservación de los alimentos.

En las últimas décadas, los lípidos oxidados han despertado un gran interés por su potencial relación con numerosas enfermedades degenerativas y crónicas como enfermedades cardiovasculares y cáncer. Sin embargo, actualmente se desconoce la contribución de los lípidos oxidados de la dieta al desarrollo de estas enfermedades, debido principalmente a que el conocimiento de las estructuras y los contenidos de los productos oxidados en alimentos es aún escaso.

1.2.1.- Proceso de autooxidación y compuestos formados

La autooxidación es el mecanismo principal de oxidación de los lípidos de los alimentos y es un proceso autocatalítico de reacciones en cadena, que transcurre a través de la formación de radicales libres, y consta de cuatro fases: iniciación, propagación, ramificación y terminación. Los mecanismos y cinética del proceso de autooxidación han sido extensamente revisados durante décadas por los investigadores más relevantes en este área (Grosch, 1987; Pokorny, 1987; Gardner, 1989; Porter *et al.*, 1995; Brimberg y Kamal-Eldin, 2003; Frankel, 2005; Choe y Min, 2007; Schneider, 2009). Los triglicéridos constituyen más del 95% de los lípidos de los alimentos y la oxidación lipídica ocurre en las cadenas insaturadas de sus restos acilo.



En la fase de iniciación (1) se forma un radical alquílico por la abstracción de un hidrógeno H^{\bullet} de un grupo metileno adyacente al doble enlace de una molécula insaturada RH , por exposición a energía luminosa, calorífica o catálisis metálica. Es la reacción menos conocida de todo el proceso. La presencia de hidroperóxidos y metales en cantidades traza parece tener un papel importante en la generación de radicales que actúan como iniciadores.

En la etapa de propagación el radical formado R^{\bullet} reacciona con el oxígeno atmosférico para formar un radical peroxilo ROO^{\bullet} y éste reacciona con una nueva molécula insaturada para originar el hidroperóxido $ROOH$ (compuesto primario de oxidación) y un nuevo radical alquílico R^{\bullet} que repite la secuencia de reacciones con otra molécula insaturada. Los radicales alílicos se forman un orden de magnitud más lentamente que los bisalílicos por la mayor estabilización por resonancia del electrón desapareado. La reacción limitante de esta fase es la (3) que permite la acumulación de hidroperóxidos y depende de la fuerza del enlace $C-H$, siendo más lábil en la posición alílica.

La ramificación consiste en la descomposición de hidroperóxidos incrementando la concentración de radicales libres. La reacción de descomposición puede ser monomolecular (4) y bimolecular (5) aunque la segunda está más favorecida porque requiere menor energía de activación.

La terminación es la eliminación de radicales del sistema (peroxilo, alcoxilo, acilo, hidroxilo e hidrógeno) para formar compuestos no radicalarios estables. La interacción de dos radicales peroxilo (6) es la más importante de las reacciones de terminación a baja temperatura. Después de la formación de los primeros radicales, las tres etapas de la oxidación ocurren simultáneamente, pero a diferentes velocidades que cambian a lo largo del proceso.

1.2.1.1.- Compuestos primarios de oxidación

Los hidroperóxidos son los compuestos primarios de oxidación y se forman tanto por reacciones de propagación como de terminación. Son compuestos inestables, que se descomponen fácilmente en radicales (principalmente alcoxil y hidroxil radicales) para formar productos secundarios de oxidación. En condiciones de temperaturas bajas y moderadas constituyen una fracción muy importante de los compuestos de oxidación. Los hidroperóxidos se forman y se descomponen simultáneamente, pero durante la primera etapa del proceso de oxidación y hasta el final del periodo de inducción la velocidad de formación es mucho mayor y se observa un aumento de hidroperóxidos. Cuando se acumulan altos niveles de hidroperóxidos su descomposición se produce más rápidamente que su formación, y aumenta la velocidad de oxidación exponencialmente.

1.2.1.2.- Compuestos secundarios de oxidación

Los compuestos secundarios se forman a partir de los hidroperóxidos a través de distintos tipos de reacciones, y pueden clasificarse en tres grupos en función del peso molecular: *monómeros oxidados*, compuestos de peso molecular similar al de los triglicéridos no oxidados; *volátiles*, compuestos de menor peso molecular que el de los triglicéridos no oxidados; y *compuestos diméricos y poliméricos*, de peso molecular muy superior al de los triglicéridos no oxidados.

Monómeros oxidados

La vía principal de descomposición de los hidroperóxidos es la escisión homolítica del grupo hidroperóxido formando radicales hidroxilo y alcoxilo (Min y Boff, 2002). El radical alcoxilo puede participar en diferentes reacciones que conducen a la formación de compuestos con funciones epoxi, hidroxil y ceto (**Figura 1.2**), entre otras, que constituyen, junto a los hidroperóxidos, el grupo mayoritario originado por degradación oxidativa a temperatura ambiente o moderada (Frankel, 2005).

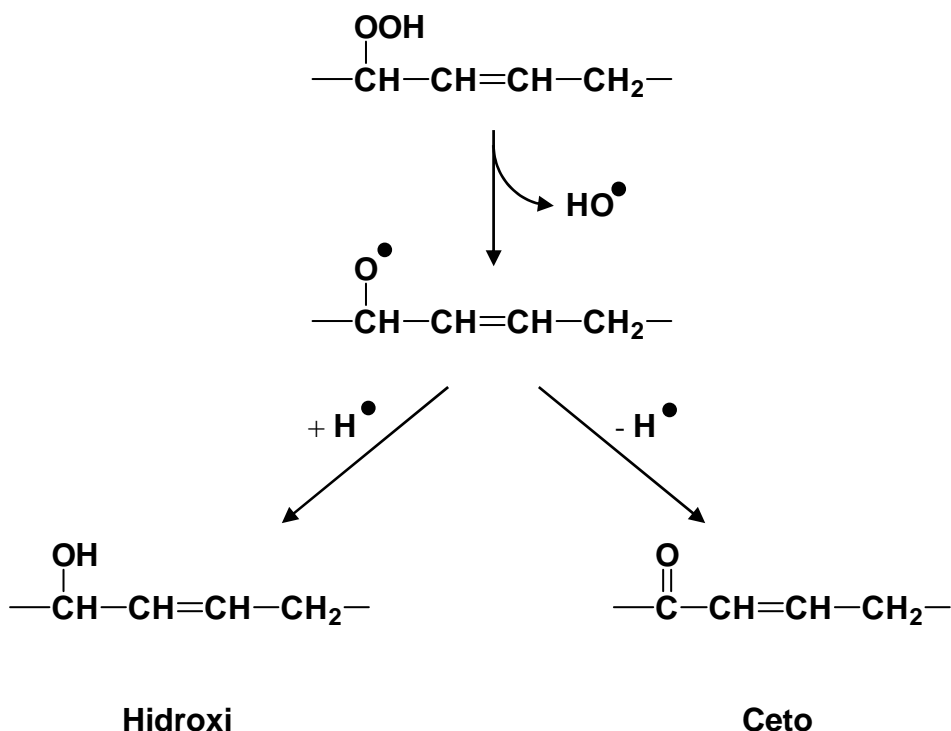


Figura 1.2. Formación de compuestos secundarios con funciones hidroxi y ceto.

Componentes volátiles

Los radicales alcóxido pueden también sufrir la escisión homolítica del enlace C-C a ambos lados del grupo funcional (posición β respecto al O), dando lugar a la formación de volátiles, como se ilustra en la **Figura 1.3**. Se produce un aldehído estable y un radical que puede reaccionar con otros radicales en juego dando lugar a compuestos estables o reaccionar con el oxígeno reiniciándose así de nuevo la cadena de propagación (Kochhar, 1993). Reacciones similares ocurren tras la escisión al otro lado de la cadena (que porta el grupo carboxilo), que darían lugar a ácidos, hidroxiácidos o aldehídos ácidos unidos al glicerol en el caso de los triglicéridos formando parte así de una molécula no volátil.

La compleja mezcla de compuestos volátiles formados sólo suponen una pequeña parte del total de los productos de oxidación pero poseen una extraordinaria importancia desde el punto de vista sensorial (Frankel, 2005; Grosch, 1987).

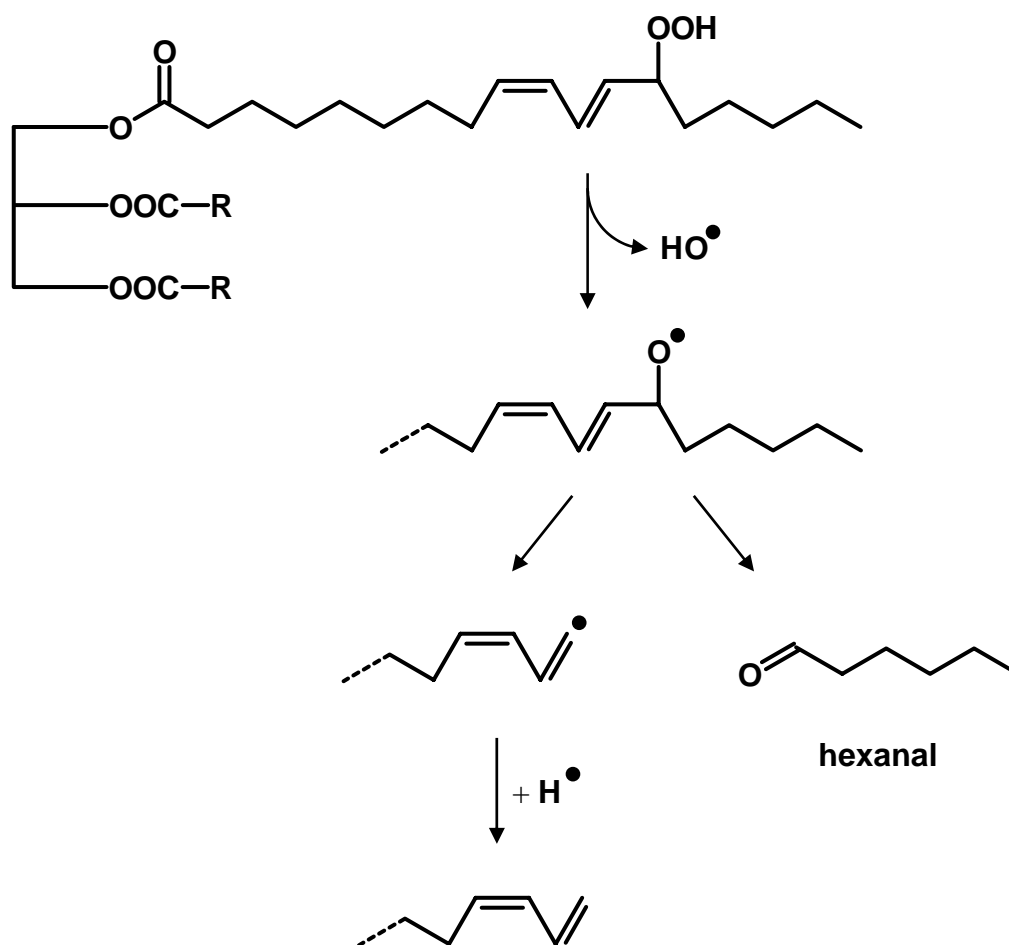


Figura 1.3. Reacción de β-escisión de los hidroperóxidos involucrados en la formación de los compuestos volátiles.

Dímeros y polímeros

Los radicales alcoxilo pueden participar así mismo en reacciones de condensación con otros radicales para formar dímeros y polímeros de triglicéridos con enlaces de tipo puente éter (C-O-C) y puente peróxido (C-O-O-C). Aunque los dímeros y polímeros son los productos mayoritarios a elevada temperatura, a la que predominan las uniones tipo éter y C-C (Neff *et al.*, 1988; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2007; Sánchez-Muniz *et al.*, 2007), también se forman a temperaturas bajas al final del periodo de inducción (Márquez-Ruiz *et al.*, 2000; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2006).

Además de la autooxidación, existen otros mecanismos de oxidación como la fotooxidación y la oxidación enzimática. La fotooxidación ocurre exclusivamente en presencia de luz y por mediación de compuestos fotosensibilizadores, como los pigmentos naturales de carnes (hemoglobina, mioglobina) y verduras (clorofila y feofitina), y se diferencia en que las reacciones de formación de hidroperóxidos transcurren mediante adición directa del oxígeno al doble enlace. La oxidación enzimática, catalizada fundamentalmente por el enzima lipoxigenasa en alimentos vegetales frescos, da lugar a los mismos hidroperóxidos que la autooxidación, diferenciándose en la estereoquímica y en las proporciones relativas debido a que la reacción es estereoespecífica y regioselectiva.

1.2.2.- Métodos analíticos para la evaluación de la oxidación lipídica

1.2.2.1.- Evaluación del estado de oxidación

Se han desarrollado un gran número de métodos analíticos para evaluar el estado de oxidación de los aceites y lípidos de los alimentos (Frankel, 2005; Kamal-Eldin y Pokorny, 2005). Sin embargo, no existe un método universal que permita evaluar el estado de oxidación de forma objetiva, por lo que se recomienda el uso combinado de métodos.

• Análisis sensorial

El análisis sensorial es el más relacionado con la calidad de los lípidos de los alimentos y a veces permite la detección de olores y sabores que no pueden ser detectados por ningún método instrumental. Sin embargo, incluso con panelistas expertos, la reproducibilidad de los resultados es baja y por ello se recomienda utilizar complementariamente métodos químicos e instrumentales (Frankel, 2005). En aceites microencapsulados, el análisis sensorial ha sido aplicado en algunos trabajos (Stapelfeldt *et al.*, 1997; Keogh *et al.*, 2001; Baik *et al.*, 2004; Jónsdóttir *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2008; Serfert *et al.*, 2010).

• Índices analíticos

Índice de peróxidos

Es un índice de gran utilidad para evaluar la oxidación primaria por tratarse de una medida de los hidroperóxidos (Dobarganes y Velasco, 2002). El índice de peróxidos es el más utilizado para evaluar el estado de oxidación en aceites y alimentos sometidos a temperatura ambiente, y concretamente en aceites microencapsulados (Kim *et al.*, 2000; Orlén *et al.*, 2000; Hardas *et al.*, 2000, 2002; Hogan *et al.*, 2003; Kagami *et al.*, 2003; Baik *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2004, 2006; Kolanowski *et al.*, 2006b; Drusch *et al.*, 2006 a, b,

c, 2007, 2008; Partanen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Serfert *et al.*, 2009 a, b; Anwar *et al.*, 2010). Sin embargo, el índice de peróxidos debe combinarse con un método que permita evaluar compuestos secundarios de oxidación.

Índice de dienos conjugados

El índice de dienos conjugados es un método indirecto que permite evaluar mediante absorción de luz UV hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, debido a que presentan dobles enlaces conjugados que absorben luz a 232 nm. Sin embargo, la relación entre formación de hidroperóxidos y formación de dienos conjugados no es siempre 1:1 debido a la presencia de hidroperóxidos monoenos y a la existencia de posteriores reacciones de ciclación y polimerización que pueden experimentar los hidroperóxidos conjugados. Además, otros compuestos secundarios con dobles enlaces conjugados absorben a la misma longitud de onda (232 nm). Por tanto, puede decirse que el método es indicativo del proceso de oxidación más que de la formación de hidroperóxidos (Halliwell y Chirico, 1993). Aun así es uno de los métodos más utilizados en aceites microencapsulados (Orlien *et al.*, 2000; Ponginebbi *et al.*, 2000; Drusch *et al.*, 2006 a, b, c).

Índice de anisidina

El índice de anisidina es una estimación del nivel de compuestos secundarios, concretamente aldehídos y principalmente 2-alquenoales (Rossell, 1994). Los análisis de índice de peróxidos (IP) e índice de anisidina (IA) se usan también combinados para obtener un índice de oxidación total indicativo de la calidad de los aceites, llamado valor de Totox ($2\text{ IP} + \text{IA}$) donde IP representa el estado de oxidación actual e IA la historia del aceite. Este índice también se aplica en aceites microencapsulados (Hogan *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2004, 2006; Drusch *et al.*, 2008).

Test del ácido tiobarbitúrico

Se basa en la reacción entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malonaldehído o un precursor de éste. La reacción no es específica y otros compuestos de oxidación reaccionan también con el ácido tiobarbitúrico y, por ello, se les denominan junto al malonaldehído TBARS (conjunto de sustancias que reaccionan con el TBA) (Pokorný *et al.*, 2005). La aplicación del método se limita a muestras de elevado grado de insaturación ya que sólo se detectan los productos de oxidación de ácidos grasos con 3 o más dobles enlaces (Pryor *et al.*, 1976). El método tiene muchos inconvenientes, como la interferencia de los productos de pardeamiento no enzimático y de degradación de proteínas y azúcares (St. Angelo, 1996). Aun así, es utilizado en aceites microencapsulados (Stapelfeldt *et al.*, 1997; Baik *et al.*, 2004; Jónsdóttir *et al.*, 2005; Hu y Zhong, 2010).

• Evaluación de compuestos de oxidación

La evaluación de los compuestos de oxidación formados, ya sean compuestos específicos o grupos de compuestos, está basada fundamentalmente en técnicas cromatográficas. Éstas se han aplicado en el caso de compuestos específicos fundamentalmente a la cuantificación de compuestos volátiles (hidrocarburos y aldehídos) y, en menor medida, debido a su complejidad, a los compuestos de oxidación mayoritarios, los no volátiles (Thomas *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1997), aun cuando éstos últimos poseen un mayor interés desde el punto de vista nutricional ya que son los ingeridos con el alimento.

Hidroperóxidos

La técnica más utilizada para el análisis de hidroperóxidos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de adsorción en fase normal con detección UV. Existen numerosos trabajos que consiguen separar isómeros geométricos y de posición de monohidroperóxidos de ácidos grasos o sus productos tras ser reducidos, así como triglicéridos que contienen un resto acilo con un grupo hidroperóxido (Chan y Levett, 1977; Neff y Frankel, 1980; Frankel *et al.*, 1990). La cromatografía HPLC se ha aplicado para el análisis cualitativo de los principales productos de oxidación de los principales ácidos grasos de los alimentos, oleico, linoleico y linolénico (Frankel, 2005), y otros como el ácido linoleico conjugado (CLA) (Hämäläinen *et al.*, 2002). También se utiliza la cromatografía HPLC en fase reversa (C₁₈) para la separación de hidroperóxidos tras la reducción a derivados hidroxilo (Park *et al.*, 1981; Miyashita *et al.*, 1990; Neff *et al.*, 1992).

Compuestos volátiles

La cromatografía gas-líquido (CG) ha sido muy empleada para analizar aldehídos, alcoholes e hidrocarburos volátiles (Frankel, 2005). En la técnica de espacio de cabeza estático, la más sencilla y rápida, sólo se detectan compuestos presentes a concentraciones superiores a 0,1 mg/kg. Sin embargo, mediante el espacio de cabeza dinámico y el método de inyección directa se pueden detectar volátiles en cantidades traza (Rossell, 1994; Frankel, 1998). La determinación de compuestos volátiles de oxidación mayoritarios, como el hexanal (Hardas *et al.*, 2000, 2002; Jónsdóttir *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006) y el propanal (Drusch *et al.*, 2006 a,b,c, 2007, 2008; Serfert *et al.*, 2009a, b; Anwar *et al.*, 2010), se ha utilizado en estudios de oxidación de aceites microencapsulados.

Compuestos monoméricos de oxidación secundaria

Los compuestos monoméricos de oxidación secundaria constituyen una compleja fracción de epóxidos, cetonas, aldehídos, alcoholes, hidroxiácidos, entre otros, y

compuestos con funciones polioxigenadas, cuya diversidad de estructuras se complica aún más en el caso de los triglicéridos, donde dichas funciones oxigenadas pueden estar en 1, 2 ó los 3 restos acilo. Dada la dificultad analítica, en triglicéridos sólo se ha abordado hasta el momento el análisis cualitativo de compuestos secundarios utilizando HPLC con detector de masas (Sjövall *et al.*, 2001, 2002; Byrdwell y Neff, 2002; Suomela *et al.*, 2004, 2005).

Utilizando la cromatografía de gases, la identificación y cuantificación de los grupos de compuestos específicos presentes en la fracción monomérica de ácidos oxidados ya se ha abordado con éxito por nuestro grupo de investigación en aceites y grasas de fritura para los grupos aldehído-ácidos y epoxiácidos (Berdeaux *et al.*, 1999, 2002; Velasco *et al.*, 2002, 2004a, 2005) y para los grupos de cetoácidos e hidroxiácidos (Marmesat *et al.*, 2008).

Compuestos diméricos y poliméricos

La cromatografía de exclusión molecular (HPSEC) es prácticamente la única técnica usada para la cuantificación de compuestos de polimerización (Wolff *et al.*, 1991; IUPAC, 1992a). Aun cuando los dímeros y polímeros constituyen una compleja mezcla de compuestos, es posible obtener un pico definido para grupos de compuestos que difieren significativamente en peso molecular, por ejemplo, los TG monoméricos, diméricos y poliméricos, con la columna y condiciones adecuadas.

El análisis directo de polímeros mediante HPSEC puede ser aplicado para evaluar la calidad de muestras donde estos compuestos son representativos de la alteración global, como ocurre con los aceites y grasas usados en fritura y a la evaluación del estado de oxidación en aceites de elevado grado de insaturación (Burkow *et al.*, 1991; Shukla y Perkins, 1991; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2006). En condiciones de conservación, la cuantificación de los compuestos de polimerización es de gran utilidad ya que los estudios realizados con compuestos modelo y aceites han demostrado que la aparición de dímeros marca el final del periodo de inducción y ocurre cuando se agotan los antioxidantes (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003a; Martín-Polvillo *et al.*, 2004). En nuestros estudios previos sobre oxidación de aceites microencapsulados la determinación de dímeros y polímeros ha sido de gran utilidad (Velasco *et al.*, 2000a; 2006; 2009a, b, c).

Determinación de pérdida de sustrato

La pérdida de ácidos grasos es una medida indirecta del grado de oxidación pues se basa en la cuantificación mediante patrón interno de los ésteres metílicos no alterados eluidos mediante CG en fase polar, y por diferencia se puede determinar la cantidad de fracción no eluida, que está constituida por ésteres metílicos oxidados (Waltking, 1973).

Sólo es útil para estadíos avanzados de oxidación por su baja sensibilidad. La determinación del índice de polienos, utilizada en aceites de pescado, se basa en este análisis. Es el cociente entre la suma de las concentraciones de EPA y DHA y la del ácido palmítico (Lin *et al.*, 1995). La pérdida de sustrato es uno de los métodos más utilizados en estudios de oxidación de ácidos grasos o ésteres metílicos microencapsulados. (Ponginebbi *et al.*, 2000; Hardas *et al.*, 2000, 2002; Minemoto *et al.*, 1997, 1999, 2002a, b; Fang *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2006).

Determinación cuantitativa de triglicéridos monómeros oxidados, dímeros y polímeros

La combinación de la cromatografía de adsorción y exclusión molecular permite la cuantificación global de los triglicéridos que han sufrido oxidación en alguno de sus restos acilo, y su distribución en tres grupos principales de compuestos –triglicéridos monómeros oxidados, dímeros y polímeros- (Dobarganes *et al.*, 1988; Márquez-Ruiz *et al.*, 1996a, b; Dobarganes *et al.*, 2000a, b; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2005, 2006; Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2007). Básicamente consiste en la separación de la muestra de aceite o lípidos por polaridad (cromatografía de adsorción con gel de sílice) en triglicéridos no oxidados y una fracción concentrada de los compuestos de oxidación. Esta última se analiza mediante cromatografía de exclusión y así pueden separarse grupos de compuestos de distinto peso molecular. Esta metodología ha sido estandarizada por la IUPAC y puede aplicarse tanto a aceites de fritura como a aceites oxidados (Dobarganes *et al.*, 2000b).

La cuantificación de los triglicéridos monómeros oxidados es de gran relevancia ya que este grupo incluye todas las moléculas monoméricas de triglicéridos con al menos un resto oxidado, ya sea con funciones hidroperóxido (compuestos de oxidación primaria), o grupos oxigenados estables, por ejemplo, funciones epoxi-, ceto- e hidrox-. (compuestos de oxidación secundaria). Por tanto, su cuantificación constituye una medida global de los compuestos de oxidación no volátiles formados mediante reacciones de propagación y terminación. Se han obtenido excelentes correlaciones entre los triglicéridos monómeros oxidados y el índice de peróxidos durante el periodo de inducción (Martín-Polvillo *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2006; Márquez-Ruiz *et al.*, 2007). La cuantificación de los triglicéridos dímeros y polímeros completa la información sobre el estado de oxidación ya que su formación indica el inicio de la fase de oxidación avanzada. La suma de triglicéridos monómeros oxidados, dímeros y polímeros es considerada la cantidad total de compuestos de oxidación no volátiles.

En estudios de oxidación lipídica esta metodología ha sido de gran utilidad para analizar la evolución de la oxidación en aceites y alimentos (Márquez-Ruiz *et al.*, 1999; Martín-Polvillo *et al.*, 2004), evaluar parámetros cinéticos (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003a,

2007) y detectar diferencias entre la oxidación de las fracciones de aceite libre y encapsulado de aceites microencapsulados (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003b; Velasco *et al.*, 2000a, 2004b, 2006).

- **Análisis mediante técnicas espectroscópicas**

En los últimos años se han extendido las aplicaciones de métodos espectroscópicos para el análisis de la oxidación lipídica, fundamentalmente la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Zamora *et al.*, 2003; Hämäläinen y Kamal-Eldin, 2005; Tyl *et al.*, 2008; Guillén y Goicoechea 2007, 2009) y la Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) (Guillén y Cabo, 2000; Guillén *et al.*, 2004; Guillén y Goicoechea, 2007). La principal ventaja de estas técnicas es su carácter no destructivo, el ahorro de reactivos y la reducción considerable del tiempo de análisis. Aunque sólo proporcionan información cualitativa relacionada con las funciones oxigenadas encontradas, en estudios realizados con FTIR se ha encontrado una estrecha correlación entre valores de índice de peróxidos y de anisidina en aceites oxidados con los valores de las frecuencias de determinadas bandas del espectro de infrarrojos (Guillén y Cabo, 2000).

1.2.3.2.- Determinación de la estabilidad oxidativa mediante métodos acelerados

La estabilidad oxidativa se define como la resistencia a la oxidación lipídica y los métodos para su determinación se basan en acelerar el desarrollo oxidativo, normalmente mediante un aumento de la temperatura o la concentración de oxígeno, de forma que los resultados obtenidos ayuden a predecir el tiempo de vida útil del aceite o alimento. Estos métodos son esenciales para la evaluación de la actividad antioxidante y han sido revisados ampliamente (Rossell, 1992, 1994; Verleyen *et al.*, 2005; Frankel, 2005). El curso de la oxidación normalmente procede lentamente en la primera fase y experimenta un cambio repentino en la velocidad de oxidación después de un cierto periodo de tiempo, llamado periodo de inducción (PI). El PI se mide, por tanto, por estimación del punto de máxima curvatura o la intersección de las dos líneas tangentes a ambas ramas de la curva de oxidación. Los métodos que más se utilizan actualmente se resumen a continuación:

Método de absorción de oxígeno (Oxidograph y Oxipres)

Se basa en la determinación de la absorción de oxígeno en aceites calentados a 100 °C, mediante la medida del descenso de presión de oxígeno. Existen equipos automatizados donde se pueden ensayar alimentos y antioxidantes volátiles. También es utilizado para determinar el periodo de inducción de aceites microencapsulados en condiciones aceleradas (Jonsdottir *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2010).

Método OSI (índice de estabilidad oxidativa) o Rancimat

Consiste en oxidar las muestras de aceite con aire a flujo constante y temperatura constante que suele fijarse entre 80-140 °C. Los compuestos volátiles que se originan, fundamentalmente ácidos orgánicos de cadena corta, son detectados por conductividad. El test OSI es un método oficial AOCS (Läubli y Bruttel, 1986). El equipo Rancimat permite evaluar en condiciones aceleradas la estabilidad oxidativa y la acción de los antioxidantes en los aceites microencapsulados (Velasco *et al.*, 2000b, 2009a).

Otros métodos

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la espectroscopía de espín electrónico (ESR) pueden ser aplicadas para la determinación de la estabilidad oxidativa. La DSC normalmente se utiliza a temperaturas entre 100 y 140 °C con flujo de oxígeno constante (Tan y Che, 2002). En el caso de la ESR, la estabilidad oxidativa se define como la resistencia de los lípidos a formar radicales a temperatura moderada (50-80°C) y, a diferencia de la mayoría de los métodos, que consideran el inicio de la fase de oxidación avanzada como el punto final del test, se basa en la medida de los radicales que se forman durante las fases más iniciales de la oxidación (Velasco *et al.*, 2004b).

1.3.- OXIDACIÓN LIPÍDICA EN ACEITES MICROENCAPSULADOS

El fenómeno de la oxidación en fase continua ha sido estudiado ampliamente, pero el estudio de la oxidación lipídica en sistemas heterofásicos o con fase lipídica discontinua es una tarea muy difícil, ya que además de las numerosas variables implicadas en la oxidación de sistemas lipídicos en fase continua (inherentes a la composición de los lípidos, es decir, el grado de insaturación, contenido de antioxidantes y prooxidantes, o relacionadas con factores extrínsecos como la disponibilidad de oxígeno, luz y temperatura), existen otros factores que pueden ejercer una importante influencia y cuya acción es aún en gran parte desconocida. Las condiciones o parámetros de preparación de los aceites e ingredientes microencapsulados determinan las variables que van a tener influencia en la oxidación lipídica de estos productos. Los estudios más relevantes en este contexto, que han servido como base para establecer los objetivos de esta Tesis, se discuten en este apartado.

1.3.1.- Parámetros

1.3.1.1.- Composición de la matriz

Existen, como se ha comentado en el apartado 1.1.2.1, una gran variedad de matrices encapsulantes, y se ha publicado un considerable número de estudios que examinan la capacidad protectora de la matriz frente a la oxidación. Sin embargo, es difícil extraer conclusiones generales porque se utilizan muchas combinaciones diferentes de componentes de la matriz y existen diferencias entre los demás parámetros de elaboración. Además, las condiciones de la oxidación, el rango de oxidación evaluado y las medidas utilizadas para su determinación son muy distintas en los estudios realizados. Entre los resultados más inesperados obtenidos en los primeros trabajos, normalmente realizados con ésteres metílicos modelo, destaca que los agentes encapsulantes que proporcionaron menores tamaños de glóbulos y mayores valores de eficacia de encapsulación no siempre retardaron la oxidación (Imagi *et al.*, 1992).

Estudios precedentes sugieren que entre las matrices más efectivas para retardar la oxidación de aceites se encuentran las basadas en caseinato sódico (Keogh *et al.*, 2001; Jonsdottir *et al.*, 2005) y en maltodextrinas con alto equivalente de dextrosa (Hogan *et al.*, 2003; Kagami *et al.*, 2003). Las seleccionadas en esta Tesis han sido una matriz láctea, compuesta por caseinato sódico y lactosa; y una matriz compuesta por maltodextrina, sacarosa y gelatina. Además, ambos tipos de matriz son representativos de los más utilizados en microencapsulación o encontrados en alimentos donde los lípidos están encapsulados de forma natural (Kelly, 2006; Drusch y Mannino, 2009).

La matriz compuesta por caseinato sódico y lactosa se utiliza frecuentemente en aceites microencapsulados y constituyen la matriz natural de productos lácteos deshidratados y determinados productos de alimentación infantil. Esta matriz ha sido utilizada por nuestro grupo de investigación anteriormente para estudiar la estabilidad oxidativa en microencapsulados de aceites con diferente susceptibilidad a la oxidación, como aceite de girasol y aceite de pescado. La combinación del poder emulsionante del caseinato sódico y la alta solubilidad proporcionada por la lactosa contribuyeron a la elevada estabilidad de las emulsiones preparadas y proporcionaron valores aceptables de protección frente a la oxidación en los aceites microencapsulados (Velasco *et al.*, 2000a, b, 2004c, 2006, 2009a, b). El efecto interfacial del caseinato, que forma un film alrededor de los glóbulos de aceite, contribuye a mejorar la estabilidad del aceite mediante la quelación de los cationes metálicos divalentes (Drusch *et al.*, 2007). El caseinato cálcico parece mostrar mejor comportamiento que el caseinato sódico porque el primero conduce a un

mayor grado de agregación con la consecuente disminución de aire ocluido y aumento de la estabilidad oxidativa (Keogh *et al.*, 2001).

En las matrices con maltodextrinas se ha observado que un incremento en el equivalente de dextrosa aumenta la vida útil del microencapsulado porque se forma una matriz más densa y por lo tanto más impermeable al oxígeno (Desobry *et al.*, 1999). El efecto protector de las maltodextrinas con diferentes equivalentes de dextrosa entre 4 y 36,5 y goma arábica en microcápsulas de aceite de naranja ha sido estudiado a 32, 45 y 60 °C utilizando medidas de volátiles, consumo de oxígeno y análisis sensorial. Las muestras con mayor estabilidad oxidativa fueron aquéllas con equivalente de dextrosa más alto (de 20, 25 y 36,5) (Anandaraman y Reineccius, 1986). Estos resultados fueron corroborados por Kagami y colaboradores (Kagami *et al.*, 2003) mediante la encapsulación de aceite de pescado con maltodextrinas y caseinato sódico ya que encontraron que las maltodextrinas con menores equivalentes de dextrosa (4 y 11) no fueron efectivas frente a la oxidación. La adición de mono o disacáridos como la sacarosa reduce el tamaño de poro y limita la difusión del oxígeno (Ponginebbi *et al.*, 2000). La gelatina, una proteína hidrosoluble derivada del colágeno, posee características fisicoquímicas muy adecuadas para la microencapsulación conjuntamente con maltodextrinas y sacarosa (Shahidi y Han, 1993; Orlie *et al.*, 2000). Orlie y colaboradores (Orlie *et al.*, 2000) evaluaron la oxidación de aceite de pescado microencapsulado en una matriz de maltodextrina, sacarosa y gelatina, mediante la adición de generadores de radicales (AMVN y AAPH) y encontraron que AMVN (lipófilo) aceleró la oxidación en aceites microencapsulados, mientras que AAPH (hidrófilo) no ejerció efecto alguno. Desafortunadamente, estos resultados se obtuvieron en un rango de oxidación muy bajo, por debajo de 15 meq O₂/kg de índice de peróxidos. Según los autores, la difusión de oxígeno a través de esta matriz fue el factor limitante para la oxidación del aceite encapsulado.

Los trabajos más recientes realizados con otras matrices indican que los polisacáridos de bajo peso molecular son más efectivos para proteger frente a la oxidación que sus análogos de alto peso molecular (Bustos *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2003; Drusch *et al.*, 2007; Serfert *et al.*, 2009b). Últimamente se han propuesto nuevas matrices basadas en trehalosa o derivados de almidón como el n-octenilsuccinato derivado para aumentar la estabilidad de aceites de pescado microencapsulado (Drusch *et al.*, 2006a, b; Serfert *et al.*, 2010). Es de destacar que la mayoría de los trabajos publicados en los últimos años permiten deducir que la Tg de la matriz utilizada es uno de los factores determinantes de su comportamiento frente al desarrollo oxidativo (Orlie *et al.*, 2000; Vega y Roos, 2006).

1.3.1.2.- Métodos de secado

El método de atomización ha sido el método utilizado en la mayoría de los trabajos donde se estudia la oxidación de los aceites microencapsulados (Keogh *et al.*, 2001, Minemoto *et al.*, 2002a, b; Kagami *et al.*, 2003; Drusch *et al.*, 2006b, c, 2007, 2008; Kolanowski *et al.*, 2006; Serfert *et al.*, 2009a, b; Anwar *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). En atomización, se ha observado que las temperaturas de entrada y salida afectan normalmente la porosidad de la matriz y, por tanto, la estabilidad oxidativa (Finney *et al.*, 2002). Otros parámetros inherentes al diseño del atomizador, como por ejemplo, la velocidad del disco en atomizadores de disco rotatorio, pueden también ser determinantes del tamaño de glóbulo y el contenido de humedad (Fang *et al.*, 2005). Recientemente, se ha encontrado que sustituir el aire por nitrógeno en el atomizador no tiene el efecto deseado en la estabilidad oxidativa del aceite de pescado, pero sí influye positivamente borboteando con nitrógeno la emulsión durante su preparación y eliminar así gran parte del aire que pueda quedar ocluido (Serfert *et al.*, 2009b).

Por sus bajas temperaturas, el proceso de liofilización es muy apropiado para aceites muy susceptibles a la oxidación como los aceites de pescado, o para aceites aromáticos y pigmentos. Es interesante mencionar que el aumento de la velocidad de congelación de la emulsión conduce a un aumento de la eficacia de microencapsulación, pero no necesariamente a una mayor estabilidad oxidativa (Heinzelmann *et al.*, 2000).

En general, la influencia de los procesos de secado por atomización y liofilización en la estabilidad oxidativa de los microencapsulados ha sido poco estudiada a partir de las mismas emulsiones. Sims y colaboradores habían mostrado que la oxidación era más rápida en muestras liofilizadas frente a atomizadas atribuyendo los resultados a la mayor área superficial de las primeras (Fioriti *et al.*, 1975; Sims, 1994). Similares conclusiones fueron extraídas por Taguchi (Taguchi *et al.*, 1992). Sin embargo, el grupo de Minemoto encontró menor oxidación en liofilizados de linoleato de metilo en goma arábica frente a sus análogos atomizados, a pesar de que los primeros mostraron mayor contenido de lípidos no encapsulados (Minemoto *et al.*, 1997).

1.3.1.3.- Grado de homogeneización

La presión de homogeneización y el número de pases aplicados en la preparación de los microencapsulados no han sido relacionados con la estabilidad oxidativa de los aceites microencapsulados. Únicamente Heinzelmann y colaboradores (2000) ensayaron el efecto del grado de homogeneización, mediante la aplicación de distintas presiones y número de pases, en la estabilidad oxidativa de aceite de pescado microencapsulado obtenido por liofilización; y concluyeron que el aumento de la presión y número de pases

incrementó la eficacia de encapsulación pero ello no se reflejó en un aumento de la estabilidad oxidativa.

La homogeneización aplicada a las muestras tiene influencia en el tamaño de glóbulo del aceite y en la eficacia de encapsulación. Dichas variables sí han sido evaluadas en relación con el desarrollo de la oxidación, tal y como se describe en los apartados 1.3.2.1. y 1.3.2.2.

1.3.2. Variables

1.3.2.1.- Distribución de los lípidos (Eficacia de encapsulación)

En la mayoría de los alimentos con elevado contenido en grasa, los demás componentes están dispersos en los lípidos y, por tanto, existe una fase lipídica continua en contacto directo con el aire. En estos sistemas, la oxidación debería transcurrir, y normalmente así es, de forma similar a los lípidos en fase continua. Sin embargo, cuando los lípidos no constituyen el componente mayoritario sino que están dispersos en otros ingredientes del alimento, la velocidad de oxidación depende de variables adicionales y puede ser superior o inferior en comparación con los mismos en fase continua. De ahí que no exista una correlación entre la cantidad de lípidos en un alimento y el desarrollo oxidativo, y que la cantidad de aceite necesaria para la aparición de rancidez dependa no sólo del tipo de aceite sino también de su área superficial y otras características del alimento (Fritsch, 1994).

Una importante variable en los alimentos con lípidos en fase dispersa, en general, y de los aceites microencapsulados, en particular, es su distribución entre lípidos más superficiales y fácilmente accesibles a la extracción con disolventes no polares y lípidos más inmersos o ligados en o a la matriz constituida por otros componentes del alimento, formando gotículas o encapsulados. Teóricamente, la fracción superficial es la más susceptible a la oxidación por su mayor exposición al aire, pero no siempre ocurre así. La disponibilidad de oxígeno en los glóbulos de aceite encapsulado puede ser muy variable, dependiendo de los factores que influyan en la formación de vacuolas de aire y en la difusión del oxígeno a través de la matriz. Además, la distribución de antioxidantes y prooxidantes en estos sistemas heterogéneos, de la cual depende su acción, también se ve afectada por numerosas variables.

Sin embargo, hasta el año 2000, cuando se iniciaron en nuestro laboratorio estudios enfocados a examinar la influencia de la distribución de los lípidos en la oxidación de aceites microencapsulados (Velasco *et al.*, 2000a), sólo se conocían dos trabajos relacionados. Se había observado que la eliminación del aceite libre aumentaba la

estabilidad (Gejl-Hansen y Flink, 1977) y que se oxidaba más rápidamente que la fracción encapsulada (Shimada *et al.*, 1991). El estudio de Shimada y colaboradores se basó en encapsular linoleato de metilo en matriz de lactosa y gelatina mediante liofilización y la evaluación de la oxidación se realizó exclusivamente mediante medida de dobles enlaces conjugados.

En experimentos realizados en nuestro laboratorio hemos observado que la oxidación relativa de ambas fracciones en aceites microencapsulados por liofilización puede ser variable, dependiendo de las condiciones de oxidación o la protección conferida por antioxidantes (Velasco *et al.*, 2000a; Márquez-Ruiz *et al.*, 2003b; Velasco *et al.*, 2006). Además, es importante destacar la discontinuidad de la oxidación observada en la fracción encapsulada, como indicaron los resultados obtenidos en la evaluación de los antioxidantes (tocoferoles) y los compuestos de polimerización en ensayos de almacenamiento (Velasco *et al.*, 2006, 2009a, b, c). Estos resultados apoyan claramente la necesidad de separar las fracciones de aceite libre y encapsulado en los estudios de oxidación y muestran la complejidad de la oxidación en aceites microencapsulados, que a menudo se refleja en la dificultad que existe para determinar el verdadero estado de oxidación en estos productos.

Por otra parte, otro grupo de investigación ha adoptado la determinación separada de la oxidación de las fracciones libre y encapsulada en estudios con compuestos modelo que proporcionaron resultados contradictorios por deficiencias en la evaluación de la oxidación observando mayor velocidad de oxidación en la fracción libre en muestras con muy bajo contenido de ésta (Ponginebbi *et al.*, 2000; Hardas *et al.*, 2000, 2002; Baik *et al.*, 2004). La importancia de estudiar la oxidación en la fracción libre es actualmente reconocida por otros autores, en el contexto de las leches en polvo (Vignolles *et al.*, 2007) y los aceites microencapsulados (Drusch y Berg, 2008).

1.3.2.2.- Tamaño de glóbulos de aceite

A pesar de que el tamaño de glóbulos es una característica considerada importante en aceites microencapsulados, su influencia en la oxidación lipídica es prácticamente desconocida.

En condiciones similares de accesibilidad de aire, teóricamente la velocidad de oxidación aumentaría al disminuir el tamaño de glóbulo de aceite por aumento de la relación superficie/volumen. Aunque este aspecto ha sido escasamente estudiado, existen resultados que muestran que la susceptibilidad a la oxidación en aceites microencapsulados disminuye cuanto menor es el tamaño de glóbulo de aceite (Minemoto *et al.*, 2002a, b; Watanabe *et al.*, 2002) o *viceversa* (Fang *et al.*, 2005). Estas

contradicciones pueden estar relacionadas con el hecho de que normalmente los cambios en tamaño de glóbulo de aceite se consiguen variando la relación entre los componentes de la matriz y las condiciones de presión para preparar la emulsión previa y en ambos casos cambiarían otras características, como la eficacia de encapsulación, que pueden influir en los resultados obtenidos.

1.3.2.3.- Actividad de agua

En general, la velocidad de oxidación lipídica es menor a bajos valores de actividad de agua, cercanos a los correspondientes a la capa monomolecular (0,2-0,4) para la mayoría de los alimentos. Esto puede ser debido a la hidratación de trazas metálicas con la consecuente disminución de su efecto catalítico, a la interacción con radicales libres y el oxígeno singulete, y a la formación de puentes de hidrógenos con los hidroperóxidos, retrasando así su descomposición. Sin embargo la velocidad de oxidación aumenta rápidamente a valores inferiores y superiores de actividad de agua correspondiente a la capa monomolecular (Labuza, 1968; Karel *et al.*, 1967). En el contexto de las leches en polvo, se ha estudiado cómo afectan los cambios en actividad de agua a la calidad de estos productos (Tamsma y Pallansch, 1964; Burvall *et al.*, 1978; Stapelfeldt *et al.*, 1997; Thomsen *et al.*, 2005).

En relación a aceites microencapsulados, Minemoto y colaboradores (Minemoto *et al.*, 1997) utilizaron las técnicas de atomización y liofilización para encapsular linoleato de metilo en goma arábica, y las muestras se oxidaron a 37 °C en un amplio rango de valores de humedad relativa: 12, 44, 75 y 96 %. La mayor estabilidad se obtuvo para las muestras liofilizadas y todas las muestras se oxidaron en menor grado a 12 y 44 % de humedad relativa. Sólo se determinó la oxidación en los lípidos totales extraídos y se dedujo la oxidación relativa de ambas fracciones a partir de la relación entre la fracción de linoleato de metilo oxidado y la fracción de lípido no encapsulado. En las muestras atomizadas, este cociente superó 1 rápidamente y llegó a un máximo de 4, y sólo superó 1 a 75% de humedad relativa en las liofilizadas. Por consiguiente, los autores dedujeron que la fracción libre no era la única que se oxidaba.

Ponginebbi y colaboradores estudiaron la oxidación de ácido linoleico encapsulado en una matriz de carbohidratos (sacarosa y maltodextrina) sometido a diferentes valores de humedad relativa (0, 32, 43 y 75 %). Las muestras a 0 y 32 % de humedad relativa se oxidaron más rápidamente que las que se encontraban a 43 y 75 %, pero en estas últimas se observaron modificaciones físicas en las muestras, como porosidad reducida, colapso de la estructura, reducción de la cantidad de aceite libre y coalescencia de los glóbulos de aceite provocada por la cristalización de la sacarosa (Ponginebbi *et al.*, 2000). En el siguiente estudio, evaluaron la oxidación de grasa láctea encapsulada en una matriz de

maltodextrina y caseinato sódico en condiciones aceleradas de oxidación con luz UV y almacenadas a 14, 44 y 52 % HR. Los resultados mostraron que la oxidación disminuía al aumentar la humedad relativa y que la fracción libre era la más rápida en oxidarse tanto con luz como en la oscuridad (Hardas *et al.*, 2002). Sin embargo, posteriormente no encontraron efecto de la humedad relativa en aceites de pescado microencapsulados conservados a 0, 11, 33 y 43 % HR (Baik *et al.*, 2004).

En trabajos desarrollados por nuestro grupo (Velasco *et al.*, 2009b), se evaluó la influencia de la humedad relativa del 32 %, correspondiente a un contenido de agua cercano a la monocapa, frente a sequedad (0 % HR), en aceites de girasol y de pescado microencapsulados por liofilización en una matriz láctea (lactosa y caseinato sódico). La humedad relativa del 32 % ejerció un considerable efecto protector frente a la oxidación en la fracción de aceite libre frente a condiciones de sequedad, pero no tuvo efecto en la fracción encapsulada. Excepto en las muestras más susceptibles a la oxidación, la fracción libre se oxidó más lentamente que la encapsulada, independientemente de la humedad relativa a la que se encontraban almacenadas. Además del efecto de la humedad, las diferencias de velocidad de oxidación observadas entre las fracciones de aceite libre y encapsulada indicaron que cuando la oxidación era más rápida por la ausencia de antioxidantes, la difusión del oxígeno a través de la matriz constituía el factor determinante de la velocidad de oxidación en la fracción encapsulada y por lo tanto la fracción de aceite libre se oxidaba más rápidamente. En cambio, en las muestras más estables, la difusión del oxígeno no era limitante en la oxidación de la fracción encapsulada, pudiendo alcanzar niveles de oxidación superiores a los de la fracción libre.

Otros trabajos sobre la influencia de la humedad relativa indican claramente que las condiciones utilizadas conllevan cambios estructurales (Partanen *et al.*, 2005; Klinkesorn *et al.*, 2005; Drusch *et al.*, 2006b; Gray *et al.*, 2008). La estabilidad oxidativa en microencapsulados de aceite de pescado en una matriz de un derivado de almidón (n-octenil succinato) ha sido relacionada con los cambios estructurales sufridos por la matriz al estar expuestos a distintos valores de humedad relativa (Partanen *et al.*, 2005; Drusch *et al.*, 2006b). Recientemente Gray y colaboradores aplicaron condiciones de humedad relativa extremas (95 %) para ver la influencia del estado de la matriz en la oxidación de ácido linoleico microencapsulado (Gray *et al.*, 2008).

1.3.2.4.- Cambios estructurales de la matriz

Como se ha comentado anteriormente, el efecto de la actividad de agua en la oxidación lipídica puede ser indirecto, y se explica mejor mediante la teoría de la transición vítrea (apartado 1.1.3.4.). La temperatura de transición vítrea (T_g) determina cuándo ocurre en una matriz amorfa el cambio de un estado vítreo a un estado gomoso. Como la

movilidad molecular está limitada en el estado vítreo y esto inhibiría las reacciones de oxidación, se ha propuesto que, para aumentar la estabilidad oxidativa, las formulaciones deben estar dirigidas a obtener matrices en el estado vítreo en las condiciones deseadas (Orlien *et al.*, 2000; Selim *et al.*, 2000). Aun así, se ha demostrado que una matriz vítrea de sacarosa, maltodextrina y gelatina proporciona sólo protección parcial frente a la oxidación ya que permite la difusión de oxígeno y otras moléculas pequeñas como iniciadores de radicales hidrofílicos (ABCPA) (Orlien *et al.*, 2006). Puede ocurrir, además, que la morfología de la matriz vítrea favorezca la oxidación por aparición de grietas, como se ha observado en un estudio que compara la oxidación del ácido linoleico en matriz de almidón de maíz en estado vítreo y gomoso (con a_w de 0,3 y 0,95, respectivamente) (Gray *et al.*, 2008).

Al aumentar la movilidad por el efecto plastificante del agua o por la temperatura, pueden tener lugar otros cambios físicos como la cristalización de los azúcares y/o el fenómeno del colapso. El colapso puede definirse como la disminución del volumen total del sistema como consecuencia de la aparición de adecuada movilidad de los componentes para producir reorganizaciones de la estructura interna, pasando de un sistema de no equilibrio a un sistema en equilibrio termodinámico. El colapso es común en la mayoría de los sistemas amorfos preparados por liofilización (Levine y Slade, 1990). En alimentos en polvo que contienen hidratos de carbono como la lactosa en la leche en polvo, la cristalización está relacionada con el fenómeno del colapso, durante el cual se libera agua desde la región cristalizada a la amorfa (Chuy y Labuza, 1994). Con el colapso se observa un aglutinamiento y una reducción del movimiento de las partículas de polvo, todo ello conduce a una disminución de la dispersibilidad, reducción de tamaño de poro y de volumen.

A 25 °C, a partir de valores de actividad de agua de 0,40 se ha observado que empieza a cristalizar la lactosa atomizada (Saltmarch y Labuza, 1980), lo que también se ha observado en leches en polvo atomizadas (Buma, 1966, 1968), y en microencapsulados constituidos por aceites, lactosa y proteínas de la leche obtenidos por atomización (Moreau y Rosenberg, 1993; Fäldt y Bergenstahl, 1995, 1996). Es interesante que aparezca más tarde la cristalización de la lactosa en leche entera en polvo que en leche desnatada en polvo cuando son expuestos a elevada humedad relativa (66,2 % o superior). Es posible que la grasa actúe como barrera hidrofóbica y puede limitar tanto la difusión de moléculas hidrofílicas como el crecimiento de los cristales de lactosa.

El colapso y la cristalización de ciertos azúcares están relacionados con la liberación parcial de los componentes encapsulados a valores de humedad relativa elevados (Gejl-Hansen y Flink, 1977; Rosenberg *et al.*, 1990; Shimada *et al.*, 1991). Así, la fracción

lipídica encapsulada puede fluir desde el interior de la matriz a la superficie, quedando de esta forma más expuesta a la acción del aire exterior. Si bien la cristalización puede aumentar la cantidad de fracción libre, ciertos autores han encontrado que el colapso, con un aumento de la densidad de la matriz produce fenómenos de re-encapsulación parcial de la fracción libre (Shimada *et al.*, 1991; Labrousse *et al.*, 1992).

1.3.2.5.- Tamaño de partícula de polvo

Teóricamente, la disminución del tamaño de partícula en los aceites microencapsulados aceleraría la oxidación por aumento del área superficial (Desobry *et al.*, 1997; Schorno *et al.*, 2010). Sin embargo, el efecto en aceites microencapsulados no ha sido examinado. Únicamente en un trabajo reciente se han evaluado muestras atomizadas con tamaños de partícula variables debido a la utilización de almidón modificado con distinto peso molecular y no se ha observado relación de este parámetro con la oxidación (Serfert *et al.*, 2009b).

1.3.2.6.- Antioxidantes

A pesar de su extraordinaria importancia, la efectividad de los antioxidantes en aceites microencapsulados y las variables que intervienen en su acción son poco conocidas. Como ocurre en otros sistemas lipídicos multifásicos, como las emulsiones, la actividad de los antioxidantes en aceites microencapsulados no puede predecirse a partir de la que muestra en el aceite en fase continua, pues su partición, distribución, interacción y orientación en las distintas fases de los aceites microencapsulados son factores de enorme influencia.

Al igual que ocurre con el estudio de otras variables, el efecto de los antioxidantes no es fácil de determinar aisladamente. Como ejemplo, la eficacia antioxidante relativa del palmitato, laurilato y caprilato de ascorbilo puede confundirse con su efecto en la disminución del tamaño de glóbulo de aceite (Watanabe *et al.*, 2002). La teoría de la paradoja polar propuesta por Porter sugiere que los antioxidantes más hidrófilos, relativamente polares, son más efectivos en fase continua, donde la relación superficie/volumen es baja, mientras que los más lipófilos, poco polares, como el tocoferol, lo son más en sistemas heterofásicos, con alta relación superficie/volumen (Porter, 1980). Así, se observa que la actividad antioxidante del tocoferol es mayor que la de su homólogo polar, Trolox C, en emulsión aceite/agua, mientras que el efecto contrario se produce en fase continua (Frankel *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994). En aceites microencapsulados, los antioxidantes lipofílicos parecen ser también más efectivos, tal y como se ha observado al comparar la eficacia del ácido ferúlico y sus ésteres (Fang *et al.*, 2006), y el α -tocopherol frente al Trolox C (Hogan *et al.*, 2003). Se ha demostrado también la efectividad del EDTA

(ácido etilendiaminotetraacético) como quelante de metales en emulsiones de microencapsulados reconstituidos en agua (Cho *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2007) o en combinación con tocoferoles en microencapsulados (Klinkesorn *et al.*, 2005).

Recientemente nuestro grupo ha estudiado la efectividad de diferentes antioxidantes fenólicos con distinto grado de polaridad en aceite de girasol microencapsulado en una matriz de caseinato sódico y lactosa mediante liofilización (Velasco *et al.*, 2009c). Se evaluó la eficacia de α -Tocoferol y Trolox, y del ácido gálico y sus ésteres derivados, galato de propilo y dodecilo, en las fracciones de aceite libre y encapsulado. El tocoferol proporcionó un mayor efecto protector que el Trolox (más de cinco veces). El ácido gálico y el galato de propilo presentaron efectos pro-oxidantes, en cambio el galato de dodecilo aumentó ligeramente la estabilidad. Es decir, los antioxidantes de menor polaridad en cada serie, tocoferol y dodecil galato, fueron los más efectivos. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en Rancimat (Velasco *et al.*, 2009a) y en emulsiones de aceite en agua con los mismos componentes caseinato sódico y lactosa (Velasco *et al.*, 2004c).

Una combinación de antioxidante lipofílico, sinergista y quelante de metales puede ser muy adecuada para retardar la oxidación de aceites microencapsulados. Por ejemplo, se ha comprobado que la mezcla ALT (ácido ascórbico, lecitina y δ -tocoferol), y recientemente la mezcla formada por palmitato de ascorbilo, lecitina o ésteres de ácido cítrico, y δ -tocoferol aumentan la estabilidad oxidativa de aceites de pescado microencapsulados (Velasco *et al.*, 2000b; Serfert *et al.*, 2009a).

Resumen de los antecedentes sobre oxidación de aceites microencapsulados

En relación con los principales parámetros (matriz encapsulante, método de secado y condiciones de homogeneización) que determinan las variables que pueden influir en el desarrollo de la oxidación de aceites microencapsulados, existe en general información escasa e incluso contradictoria.

La elección de la matriz encapsulante más eficaz en la protección frente a la oxidación es el objetivo de un considerable número de estudios aunque éstos sólo se centran en la comparación entre varios tipos de matriz sin considerar la influencia de las condiciones de preparación de la emulsión, que normalmente difieren según la matriz utilizada. El método de secado más empleado y por tanto más evaluado respecto a su influencia en la oxidación es el proceso de atomización, seguido de la liofilización. Los resultados discordantes encontrados en los pocos estudios realizados que comparan ambos métodos partiendo de las mismas emulsiones evidencian la necesidad de profundizar en este aspecto. Respecto a las condiciones de homogeneización (presión aplicada y número de pases) sólo se ha encontrado un único trabajo que examine su efecto en la oxidación de aceites microencapsulados, a pesar de que parece demostrada la influencia que tienen las condiciones de homogeneización en algunas de las variables más importantes implicadas en el desarrollo oxidativo, como el tamaño de glóbulo de aceite y la eficacia de encapsulación.

Las condiciones utilizadas en los experimentos de oxidación, los métodos de extracción aplicados, los rangos de oxidación evaluados y los métodos seleccionados para la determinación de la oxidación en aceites microencapsulados son muy diversos, y de ahí que sea muy difícil extraer conclusiones de aplicación general.

Las condiciones más apropiadas para evaluar el comportamiento oxidativo de estos productos incluirían temperaturas cercanas a la temperatura ambiente y condiciones de humedad relativa que no conduzcan a cambios estructurales de la matriz, y no ocurre así en la mayoría de los estudios publicados. Los métodos de extracción necesarios para determinar el estado de oxidación en aceites microencapsulados requieren la separación de la fracción de aceite libre, normalmente minoritaria, y la fracción de aceite encapsulado, ya que la oxidación relativa de ambas fracciones puede ser variable y resultar enmascarada al evaluar sólo el aceite total. Sin embargo, sólo en algunos trabajos se realiza dicha separación de fracciones. En cuanto al rango de oxidación estudiado, muchos estudios se limitan a un rango extremadamente bajo, muy lejano del final del periodo de inducción y por tanto no indicativo ni predictivo del comportamiento oxidativo. En otros trabajos ocurre lo contrario, el rango evaluado no es adecuado porque corresponde a estadíos avanzados de oxidación. En gran manera, el establecimiento de

los rangos de oxidación estudiados depende de los métodos utilizados, que normalmente se limitan a evaluar compuestos que se encuentran mayoritariamente sólo en etapas iniciales o están presentes sólo en fases avanzadas de oxidación. Por ello, es esencial aplicar una combinación de métodos que permita la evaluación objetiva y global de la oxidación de aceites microencapsulados.

2.OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis consiste en profundizar en el estudio de la oxidación de aceites microencapsulados almacenados a temperatura ambiente. Con este fin, se han realizado estudios tanto en sistemas modelos de aceites microencapsulados preparados en el laboratorio y planta piloto, como en ingredientes o alimentos comercializados que los contienen. Debido a la complejidad de estos sistemas lipídicos discontinuos y a la gran cantidad de factores implicados en su oxidación, existe un conocimiento limitado sobre este tema, aun siendo de gran interés debido a la amplia utilización de los aceites microencapsulados como ingredientes o alimentos.

Para la consecución de este trabajo se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de la influencia del tipo de matriz encapsulante y de las condiciones de preparación (presión y número de pases en la elaboración de la emulsión y método de secado) en las propiedades fisicoquímicas de los aceites microencapsulados.
- Selección de los métodos analíticos más adecuados para la evaluación de la oxidación en estos sistemas.
- Estudio de la influencia de la matriz, el método de secado y la presión de homogeneización en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados en sistemas modelo.
- Estudio de la evolución de la oxidación en muestras representativas de aceites microencapsulados utilizados como alimentos (aceite rico en CLA y fórmulas infantiles).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- REACTIVOS

- Agentes encapsulantes:

- Caseinato sódico: Caseinato sódico procedente de leche bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA).
- Lactosa: D-lactosa monohidratada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA).
- Maltodextrina: Maltodextrina de almidón de maíz con un equivalente de dextrosa de 10 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Alemania).
- Sacarosa: 99,5 % pureza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA).
- Gelatina: Gelatina Tipo B de piel bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., USA).

- Antioxidantes:

Vitamina E ($\geq 97\%$ α -Tocoferol), α -Tocoferol ($\geq 99\%$ pureza), β -tocoferol ($\geq 99\%$ pureza) y γ -Tocoferol ($\geq 99\%$ pureza) procedentes de Sigma- Aldrich, St. Louis, MO., USA.

- Disolventes:

Todos los disolventes utilizados fueron de grado analítico, a excepción de los utilizados para los análisis cromatográficos (grado de HPLC).

- n-Hexano, éter dietílico, éter de petróleo, hidróxido amónico (30%), etanol (96%), ácido acético glacial, triclorometano, ácido clorhídrico (37%) todos ellos suministrados por Panreac (Barcelona, España).
- Tetrahidrofurano (99,9% pureza) y n-hexano (95% pureza) grado HPLC fueron suministrados por Romil (Romil LTD, Cambrighe, UK) y 2-propanol para HPLC por Merck (Merck, Darmstadt).

- Otros:

- Tiosulfato sódico (0,05 M), yoduro potásico, yodato potásico, almidón soluble, hidróxido sódico (85%), gel de sílice 60 (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Yodo crudo, sulfato sódico anhidro (Panreac, Barcelona, España).

3.2.- MUESTRAS

3.2.1.- Aceites

- **Aceite de girasol:** Aceite de girasol comercial refinado, “Koipesol” sin aditivos. De acuerdo al fabricante, el aceite presentaba un valor de acidez máximo de 0,2°, con un contenido de α -Tocoferol de 720 mg/kg.
- **Aceite de cártamo:** Aceite de cártamo refinado adquirido en Interfat SA (Barcelona, España), y cuya composición en ácidos grasos fue de 7,2 % C16:0, 2,6 % C18:0, 13,7 % C18:1 y 74,7 % C18:2. De acuerdo al fabricante, su índice de acidez máximo fue de 1°.
- **Aceite Tonalin® TG80:** Suministrado por Cognis Nutrition and Health (Cincinnati, OH, USA), derivado del aceite de cártamo y con un contenido en triglicéridos de aproximadamente el 80% y con una composición en ácidos grasos de 74-84 % de isómeros de ácido linoleico conjugado, 10-20 % C18:1, un máximo de un 4% de C16:0, máximo de 4% de C18:0 y un máximo de 3% de ácido linoleico. De acuerdo al fabricante el aceite presentaba un contenido de 1000 mg/kg de mezcla de tocoferoles.

3.2.2.- Aceites microencapsulados

Se prepararon microencapsulados de aceite de girasol en el laboratorio mediante secado por liofilización y en planta piloto mediante atomización.

Se han seleccionado como matrices encapsulantes mezclas de proteínas-hidratos de carbono frecuentemente utilizadas en la elaboración de ingredientes funcionales.

3.2.2.1.- Matrices

- **Matriz láctea:**

Los aceites microencapsulados preparados con caseinato sódico y lactosa (matriz láctea) son representativos de ingredientes funcionales utilizados en productos lácteos y en fórmulas infantiles.

Se prepararon a partir de emulsiones de aceite en agua, conteniendo los componentes de encapsulación -caseinato sódico y lactosa- disueltos en la fase acuosa. La relación porcentual en peso de los componentes fue de 10:10:10:70 para el aceite, caseinato sódico, lactosa y agua, respectivamente.

En 490 g de agua desionizada se disolvieron 70 g de caseinato sódico a 55 °C y con agitación durante 24 h. Tras enfriar la solución a temperatura ambiente, se disolvieron 70 g

de D-lactosa. Finalmente, se añadieron 70 g de aceite y se preparó una primera pre-emulsión en un homogeneizador de palas Ultraturrax.

• **Matriz maltodextrina-sacarosa:**

Los aceites microencapsulados preparados con maltodextrina, sacarosa y gelatina son representativos de ingredientes funcionales utilizados en productos de panadería y zumos.

Se preparó una disolución acuosa de gelatina al 6,29 % en peso, utilizada como emulsionante. Para ello, se disolvieron 25 g de gelatina en 372 g de agua desionizada a 100 °C con agitación. Posteriormente la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente en 349 g de agua desionizada se añadieron 150 g de la disolución de gelatina preparada previamente, 46,63 g de maltodextrina, 84 g de sacarosa y finalmente 70 g de aceite.

La relación porcentual de los componentes fue de 1:7:12:10:70 para gelatina, maltodextrina, sacarosa, aceite y agua, respectivamente.

3.2.2.2.- Preparación de las emulsiones

Para ambos tipos de matrices, la preparación de la pre-emulsión se llevó a cabo en un homogeneizador de palas Ultraturrax DI-25 basic (Ika, Alemania) aumentando progresivamente la velocidad de homogeneización bajo las siguientes condiciones: 8000 rpm durante 2 min, 9500 rpm durante 2 min y 13500 rpm durante 1 min. La homogenización a altas presiones se realizó en un homogeneizador EmulsiFlex-C5 (Avestin Inc., Canadá) aplicando presiones de homogeneización de 15 MPa (2143 psi) o 70 MPa (10 000 psi) y uno o dos pases.

3.2.2.3.- Secado

El secado de las emulsiones se llevó a cabo por liofilización o atomización bajo las condiciones que se detallan a continuación.

- *Liofilización*: Las emulsiones fueron congeladas en bolsas de hielo a -32 °C durante 24 h y liofilizadas en un liofilizador de escala de laboratorio (FD3, Heto, Dinamarca). La liofilización tuvo lugar a -50 °C y 10^{-2} mm Hg durante 48 h.

- *Atomización*: Las muestras atomizadas fueron preparadas en un atomizador de escala de planta piloto (Anhydro, Dinamarca). El atomizador utilizado dispone de una bomba de alimentación de tipo peristáltica, con una capacidad 7 L/h, de una torre de secado, donde

la muestra es dispersada mediante un disco rotatorio, y de un ciclón separador. La emulsión en forma de gotas es dispersada en la cámara de secado desde la parte superior y aspirada desde la parte inferior mediante el ciclón separador, asistido con un ventilador. El flujo de la emulsión fue ajustado para operar a una temperatura de entrada en la cámara de 220 °C y una temperatura de salida de 90 °C. Debido a su elevada viscosidad, las emulsiones no pudieron ser bombeadas con la bomba peristáltica a la torre de secado. Para ello, fue necesario disminuir la viscosidad adicionando agua al 50% p/p sobre las emulsiones preparadas.

3.2.2.4.- Molienda

Para la obtención del producto final en polvo, las muestras liofilizadas fueron sometidas a un proceso de molienda. La molienda se realizó bajo condiciones controladas en un molinillo de cocina, utilizado normalmente para moler granos de café. La cantidad de muestra a moler (15-20 g) y el tiempo de molienda (10 s) fueron los mismos en cada operación.

- Microencapsulados exentos de fracción de aceite libre. Para la eliminación de la fracción de aceite libre muestras de microencapsulados fueron sometidas a una extracción con hexano siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3.1. Para ello, en cada operación de extracción se utilizó una cantidad de muestra de 100 g de microencapsulados y 200 mL de disolvente.

3.2.3.- Aceite Tonalin® microencapsulado

Suministrado por Central Lechera Asturiana (CAPSA) y obtenido mediante atomización de un producto lácteo comercial (Natlínea) elaborado mediante homogeneización (2 pases a 20 MPa) de leche desnatada y aceite Tonalin® TG-80 (0,6 %). De acuerdo con el fabricante, el producto en polvo contenía 10 % de lípidos (de los cuales el 6 % de Tonalin® TG-80), 36 % de proteínas y 54 % de hidratos de carbono.

3.2.4.- Fórmulas infantiles comerciales

Las fórmulas infantiles de inicio y continuación fueron proporcionadas por la empresa Hero (Hero España, S.A). De acuerdo con el fabricante, las fórmulas de inicio (Hero Baby Inicia) contenían 29 % de grasas, 53,8 % de hidratos de carbono y 10,8 % de proteínas. Los ingredientes fueron suero lácteo desmineralizado, aceites vegetales, leche descremada, lactosa, minerales, lecitina, aminoácidos (arginina, histidina y triptófano), vitaminas (C, E, niacina, ác. pantoténico, B1, B6, A, B2, ác. fólico, K, biotina, D3 y B12), colina taurina, inositol y carnitina.

Las fórmulas de continuación (Hero Baby Avanza) contenían 25 % de grasas, 56,3 % de hidratos de carbono y 12 % de proteínas. Los ingredientes fueron maltodextrinas, leche descremada, aceites vegetales, suero lácteo desmineralizado, minerales, lactosa, lecitina, vitaminas (C, E, niacina, ác. pantoténico, B1, B6, A, B2, ác. fólico, K, biotina, D3 y B12), taurina, inositol, colina y carnitina.

3.3.- CARACTERIZACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS

3.3.1.- Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación (EE) viene determinada por la relación entre la cantidad de aceite encapsulado y la cantidad de aceite total.

Cálculo de la eficacia de encapsulación:

A partir de las determinaciones de extracción cuantitativa de las fracciones de aceite libre y de aceite total que se describen posteriormente se calculó la EE como:

$$EE (\%) = \frac{\text{Aceite total (g/100 g producto)} - \text{Aceite superficial (g/100 g producto)}}{\text{Aceite total (g/100 g producto)}} 100$$

3.3.1.1.- Extracción de la fracción de aceite libre o no encapsulado

La fracción de aceite libre o no encapsulado fue determinada cuantitativamente de acuerdo con el método de Sankarikutty y colaboradores (Sankarikutty *et al.*, 1988). Consiste en una simple extracción con hexano a temperatura ambiente.

Procedimiento analítico:

A 10 g de microencapsulados se adicionan 100 mL de hexano y se agita durante 10 min a temperatura ambiente con agitador magnético. Después de filtrar el extracto sobre papel de filtro, el disolvente se evapora en un rotavapor a 55 °C y se seca el extracto con una corriente de nitrógeno hasta peso constante.

3.3.1.2.- Extracción de la fracción total de aceite

El procedimiento de extracción de la fracción total de aceite estuvo basado en el método de Rose-Gottlieb (Richardson, 1985), ampliamente aceptado para la determinación cuantitativa de grasa en muestras de leche y de leche en polvo.

Procedimiento analítico:

Se adicionan 4 g de microencapsulados a 40 mL de agua desionizada calentada a 65 °C. Tras agitación, se añaden 8 mL de NH₄OH al 30 % (p/p) y se agita en baño de agua a 65 °C durante 15 minutos. Se deja enfriar el sistema hasta temperatura ambiente y se procede a la extracción. Se emplearon tres extracciones líquido-líquido con las siguientes mezclas de disolventes:

1ª Extracción: 20 mL de etanol, 50 mL de éter dietílico y 50 mL de éter de petróleo.

2ª Extracción: 10 mL de etanol, 25 mL de éter dietílico y 25 mL de éter de petróleo.

3ª Extracción: 25 mL de éter dietílico y 25 mL de éter de petróleo.

Después de filtrar los correspondientes extractos en papel de filtro conteniendo Na₂SO₄ anhidro, los disolventes son eliminados por evaporación en un rotavapor a 55 °C. A continuación, la muestra se lleva a peso constante utilizando una corriente de nitrógeno.

3.3.2.- Tamaño promedio de glóbulos de aceite y dispersión de tamaños

Para la determinación del tamaño de glóbulos de aceite se utilizó un analizador de partículas de difracción láser Mastersizer X (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) con una radiación proveniente de He-Ne $2 \cdot 10^{-2}$ W ($\lambda = 633$ nm) y lentes de 45 mm (rango de tamaño 0,05 - 80 μ m) o 100 mm (rango de tamaño 0,2 -180 μ m). Para los cálculos se utilizó un índice de refracción relativa $n_{\text{aceite}}/n_{\text{agua}} = 1,095$ y un valor de absorción de 0,1.

Las medidas se realizaron sobre emulsiones reconstituidas en agua de los aceites microencapsulados, utilizando una relación sólidos:agua de 1:7 p/p.

Los parámetros determinados fueron el tamaño promedio de gotas de aceite, $d_{(v, 0,5)}$, la dispersión de tamaños, $d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$, y el diámetro medio del momento superficial o diámetro de Sauter D [3,2].

- $d_{(v, 0,5)}$ (percentil 50): Diámetro asociado a la mediana de la distribución del volumen relativo de la fase dispersa por tamaños de gotas.
- $d_{(v, 0,9)}$ (percentil 90): Diámetro equivalente por debajo del cual se encuentra el 90 % del volumen de la fase dispersa.
- $d_{(v, 0,1)}$ (percentil 10): Diámetro equivalente por debajo del cual se encuentra el 10 % del volumen de la fase dispersa.
- **Diámetro medio del momento superficial o diámetro de “Sauter” (D[3,2]):** Es el diámetro de una gota con una relación entre su volumen y área superficial igual a la relación existente entre el volumen total de todas las gotas y la superficie total de las

mismas. Por tanto, se relaciona con la superficie específica de las gotas y es apropiado cuando se requiere representar una medida del área superficial. Este diámetro es el más utilizado para el análisis de datos de distribuciones de tamaños de glóbulos y partículas en emulsiones alimentarias.

$$D[3,2] = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2}$$

n_i : número de gotas con un diámetro d_i

• **Área de superficie específica (ASE):** es la relación existente entre el área superficial de la fase dispersa y el volumen de la misma.

$$ASE = 6 / D[3,2]$$

$$A = 4\pi r^2 = \pi d^2$$

$$V = 4/3 \pi r^3 = \pi d^3 / 6$$

$$A/V = 6 d^2 / d^3 = 6 / D[3,2] = 6/d$$

Procedimiento analítico:

Se resuspendieron 0,5 g de microencapsulado en 3,5 g de agua destilada. Se realizaron tres medidas que fueron repetidas a los 15 min para verificar la estabilidad de la emulsión y descartar fenómenos como la floculación.

3.3.3.- Tamaño de partículas de polvo

El tamaño de las partículas de microencapsulados fue determinado mediante granulometría en vía seca. La granulometría consiste en la separación de partículas mediante tamices de malla.

Procedimiento analítico:

Se utilizó una tamizadora automática AS-200 (RETSCH, Alemania) con 7 cribas con luz de malla de 800, 600, 315, 200, 160, 125 y 75 μ m, respectivamente. La cantidad de muestra analizada fue de 20 g y las condiciones utilizadas consistieron en una amplitud de oscilación de 1,2 mm/"g" y un tiempo total de 8 min a intervalos de 10 s. La cantidad de muestra en cada criba se determinó por gravimetría.

3.3.4.- Actividad de agua

La medida de la actividad de agua se realizó con un higrómetro portátil Pa_wKit (DECAGON, USA), cuyo sistema de medida está basado en los cambios de la constante dieléctrica de un material polimérico poroso. El sensor está situado en el espacio de cabeza de una cámara sellada. Las propiedades eléctricas del polímero cambian en función de la humedad relativa de la cámara. En el equilibrio, la humedad relativa proporcionada por la muestra en el espacio de cabeza a una temperatura dada es igual a la actividad de agua de la muestra. Para las medidas se utilizó una cantidad de muestra en polvo de 2 g.

3.3.5.- Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro DSC Q 2000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Para la calibración del flujo de calor y la temperatura se utilizó indio como estándar. La recta de calibrado fue verificada con zinc.

Procedimiento analítico:

Se analizaron muestras de 5-15 mg en cápsulas de aluminio herméticamente selladas, de 40 µL de volumen. Como referencia, se utilizó una cápsula de aluminio vacía. Las medidas se realizaron en un rango de temperaturas de 0 a 125 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para verificar que el proceso endotérmico observado era el resultado de la transición vítrea las muestras fueron analizadas en sentido inverso, es decir, durante su enfriamiento. De esta forma se pudo comprobar la reversibilidad de la transición. Se tomaron como valores de T_g los proporcionados por el modo automático del programa Universal Analysis 2000, versión 4.3 A (TA Instruments, New Castle, DE, USA), que consiste en la temperatura a la cual se produce el punto de inflexión del cambio brusco en el flujo de calor.

3.3.6.- Densidad a granel y compresibilidad de aceites microencapsulados

Se realizaron medidas de volúmenes a partir de las cuales se obtuvieron dos tipos de densidad a granel (“bulk density”) de los aceites microencapsulados: la densidad aireada (A) y la densidad empacada (P) (Abdullah y Geldart, 1999).

La densidad aireada se determina permitiendo que el polvo se asiente en un recipiente bajo la influencia de la gravedad, mientras que la densidad empacada se mide tras golpear el contenedor donde se encuentra el microencapsulado “aireado”.

A partir de los valores de A y P se calculó el contenido de aire intersticial, que es el aire que se encuentra entre las partículas (Westergaard, 1994; Vignolles *et al.*, 2009a):

$$\text{Contenido de aire intersticial} = (1 / A) - (1 / P) \quad (\text{mm}^3 / \text{g})$$

Igualmente, con los valores de A y P se determinaron los valores de compresibilidad, que refleja la capacidad de un material en polvo para ser compactado en un volumen pequeño y depende principalmente del tamaño de los huecos entre partículas. Se calcula a partir de la siguiente expresión (Kagami *et al.*, 2003):

$$\text{Compresibilidad (\%)} = (P - A) \times 100 / P$$

Procedimiento analítico:

- Densidad aireada (A):

Se pesa una muestra de 25 g de microencapsulados, se introduce en una probeta de 100 mL ($\pm 0,5$ mL) y se mide el volumen que ocupa.

- Densidad empacada (P):

Una vez medida la densidad aireada, con ligeros golpes sobre la mesa para eliminar el aire entre las partículas se determina la densidad empacada.

3.3.7.- Medidas de color

Las medidas de color de las muestras de microencapsulados se realizaron con un colorímetro Konica Minolta CM-3500d que posee un rango de medida de 400-780 nm y proporciona el espacio de color $L^*a^*b^*$ (también llamado CIELAB), que es uno de los métodos más utilizados para medir el color en numerosos campos. En este espacio, L^* indica luminosidad mientras que a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad. En este diagrama, a^* y b^* indican direcciones de colores: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul. D65 es un iluminante estandarizado que describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental.

Procedimiento analítico:

La muestra se colocó sobre una placa Petri y se realizaron medidas en tres partes de la muestra para obtener un resultado homogéneo y más real.

3.3.8.- Solubilidad en agua de aceites microencapsulados

El procedimiento utilizado para medir la solubilidad es un método sencillo propuesto por Jiménez y colaboradores (Jiménez *et al.*, 2008).

Procedimiento analítico:

Se disuelven 2 g de microencapsulados en 50 mL de agua destilada a 26 °C con agitación a 300 r.p.m y se mide el tiempo que tarda en disolverse.

3.3.9.- Índice de estabilidad oxidativa en Rancimat

El índice de estabilidad oxidativa se determinó en el aceite inicial y los aceites microencapsulados. Se utilizó un equipo Rancimat modelo 679 (Metrhom, Suiza) y se siguió el procedimiento propuesto por Velasco *et al.* (2000b). La medida está basada en la detección de conductividad eléctrica de ciertos productos volátiles de descomposición de las grasas, principalmente ácidos grasos cortos como el ácido fórmico.

El equipo consta de una unidad de control, constituida por un procesador de datos y registrador, y una unidad de desarrollo, constituida por un bloque calefactor, que permite establecer temperaturas de oxidación comprendidas entre 50 y 200 °C, y de celdas de conductividad; donde se realiza la medida. Las muestras son sometidas a alta temperatura, y elevada disponibilidad de oxígeno mediante una corriente de aire que pasa por la muestra recogiendo los compuestos volátiles originados y transportándolos hasta las celdas de medida, donde son disueltos en agua desionizada.

Procedimiento analítico:

Se dispone la muestra (5 g de aceite microencapsulado ó 2 g de aceite) en el tubo de reacción normalizado, perfectamente limpio y seco. Se adicionan 60 mL de agua desionizada al recipiente donde se introduce el electrodo y donde se recogen los componentes volátiles que se desprenden del tubo de reacción. La determinación se realizó a 100 °C con un flujo de aire de 20 L/h. Cuando la temperatura del calefactor se estabiliza comienza la evaluación de la conductividad que se registra de forma continua frente al tiempo. El aparato tiene la capacidad de proporcionar tres modos de evaluación distintos que pueden ser seleccionados de forma conjunta o individualmente:

Modo de evaluación 1: Determinación del periodo de inducción como tiempo necesario, expresado en horas, para alcanzar el punto de máxima curvatura en la curva de conductividad. Viene designado como el punto de intersección de las dos rectas tangentes a las ramas de la curva.

Modo de evaluación 2: Determinación del tiempo necesario para la detección de un cambio de conductividad preestablecido.

Modo de evaluación 3: Determinación del cambio de conductividad durante un intervalo de tiempo preestablecido.

3.3.10.- Composición en ácidos grasos

La composición en ácidos grasos fue determinada, en el aceite inicial y en los aceites extraídos de microencapsulados iniciales, por cromatografía de gases mediante previa derivatización a ésteres metílicos de ácidos grasos de acuerdo a la normativa IUPAC (IUPAC 1992c, d).

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP-6890 (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) equipado con un inyector split/splitless, una columna capilar HP Innowax (polietilenglicol, 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria) y un detector de ionización de llama. El programa de temperatura utilizado fue de 180 °C (2 min), 3 °C/min a 230 °C (20 min). La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C y en el inyector se aplicó una relación de división de 1:40. Se utilizó H₂ como gas portador y flujo constante a 1 mL/min.

Procedimiento analítico:

- En un tubo con tapa de 2 mL se pesan 50 mg de muestra de aceite y se disuelven en 1 mL de n-hexano.
- Se añade 0,1 mL de KOH en metanol 2 M y se agita en vortex durante 1 minuto, seguido de 5 minutos de reposo. A continuación, se añaden 0,13 g de Na₂SO₄ anhidro y se centrifuga (12000 r.p.m, 5 min, a 0°C).
- Se toman 2 μ L de la fase de hexano y se inyectan en el cromatógrafo de gases.

3.3.11.- Determinación de compuestos de oxidación e hidrólisis

Los compuestos de oxidación e hidrólisis fueron cuantificados en el aceite inicial y en los aceites microencapsulados iniciales. Para ello se aplicó el método propuesto por Márquez-Ruiz *et al.* (1996a) para la evaluación de la oxidación en aceites y grasas vegetales. El método consiste en la obtención de la fracción más polar del aceite mediante separación en fase sólida en cartuchos de sílice y en su posterior separación en diferentes grupos de compuestos por pesos moleculares mediante cromatografía de exclusión molecular de alta eficacia (HPSEC) con índice de refracción. En orden de elución los grupos de compuestos separados son polímeros de triglicéridos, dímeros de triglicéridos y

triglicéridos monómeros oxidados, que constituyen los compuestos de oxidación, y diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, que forman los compuestos de hidrólisis. La cuantificación de los diferentes grupos de compuestos se realiza mediante el método del patrón interno usando monoestearina.

Procedimiento analítico:

a) *Preparación de la disolución del patrón interno.* Se prepara una disolución del patrón interno (5 mg/mL) disolviendo 500 mg de monoestearina en 100 mL de éter diisopropílico.

b) *Preparación de la muestra.* Se pesan 50 mg de aceite en un vial y se disuelven en 2 mL de hexano.

c) *Extracción en fase sólida (SPE).* Se utilizan cartuchos Sep-pak de 1 g de sílice y el fraccionamiento se realiza con ayuda de vacío. Se acondicionan los cartuchos pasando 10 mL de la fase móvil correspondiente a la primera elución (hexano:éter dietílico 90:10 v/v). Se transfiere la muestra disuelta en hexano al cartucho. La fracción no polar, principalmente triglicéridos no alterados, se eluye con 15 mL de hexano:éter dietílico 90:10 v/v. La fracción no polar se recoge en un matraz de vidrio de 25 mL de forma cónica, provisto de cierre esmerilado. La segunda fracción, que contiene los compuestos polares, se eluye con 15 mL de éter dietílico y se recoge en un matraz de vidrio de 25 mL de forma cónica, provisto de cierre esmerilado. Se evapora el disolvente de ambas fracciones en un rotavapor y la primera fracción, la no polar, se disuelve de nuevo con 2 mL de hexano. A la segunda fracción se le añaden 200 µL del patrón interno, para el inmediato análisis por cromatografía de exclusión.

d) *Cromatografía líquida de exclusión molecular de alta eficacia (HPSEC).* Las fracciones polares se analizan utilizando las siguientes condiciones:

- Un inyector Rheodyne 7725i (Waters, Milford, MA, USA) con un volumen de muestra de 10 µL.
- Una bomba HPLC Knauer 1200 (Knauer, Berlín, Alemania).
- Dos columnas de PLgel (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) rellenas de copolímeros de estireno y divinilbenceno (25 cm de longitud x 0.77 cm d.i. y partículas de 5 µm), de 500 y 100 Å de tamaño de poro, conectadas en serie. Este sistema permite una separación teórica en el rango de pesos moleculares de 10 000 a 1 000 y de 5 000 a 300, respectivamente.
- Volumen de muestra inyectada: 20 µL
- Fase móvil: Tetrahidrofurano
- Flujo: 1,0 mL/min
- Detector de índice de refracción Waters 2414 (Waters, Milford, MA, USA)
- Integrador Turbochrom Workstation 6.1 (PerkinElmer, Boston, MA, USA)

La cuantificación de los diferentes grupos de compuestos polares (x) se realizó mediante el método del patrón interno asumiendo el mismo factor de respuesta (Dobarganes *et al.*, 1988), según la siguiente expresión:

$$x \text{ (mg / g aceite)} = \frac{A_x}{A_{Pin}} \frac{C_{Pin}}{C_{ac}} 1000$$

donde A_x es el área del pico correspondiente, A_{Pin} y C_{Pin} el área y la concentración del patrón en mg/mL y C_{ac} la concentración de la muestra de aceite en mg/mL.

e) *Comprobación de la eficacia de la separación por cromatografía en capa fina.* Para comprobar que la separación por SPE ha sido correcta, previamente al análisis por HPSEC, se utiliza la cromatografía en capa fina. En una placa de 10 cm de largo por 5 cm de ancho, cubierta con gel de sílice (Silica Gel 60) de 0,25 mm de espesor, se depositan varias gotas de ambas fracciones disueltas en hexano. La placa así preparada se desarrolla con hexano: éter dietílico: ácido acético 80:20:1 (v/v/v) y las bandas son visualizadas con vapores de yodo.

3.4.- ENSAYOS DE OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS

Para el estudio de la evolución de la oxidación de los aceites microencapsulados, se preparó un lote de cada una de las muestras con las diferentes condiciones de preparación comentadas anteriormente (apartado 3.2.2). Los ensayos de oxidación se han realizado en las siguientes condiciones: las muestras de aceite de girasol microencapsulado, de aceite de Tonalin® microencapsulado y las fórmulas infantiles fueron distribuidas en placas Petri (10 g por placa) e introducidas en tres desecadores con gel de sílice para su conservación en atmósfera de sequedad, es decir, a humedad relativa de 0,0 %. Los desecadores se colocaron en una estufa a 30 °C y en ausencia de luz. Se almacenaron también muestras de fórmulas infantiles en su propio envase (latas) en una cámara termostatzada a 25 °C hasta su fecha de caducidad. Las condiciones seleccionadas para los ensayos, a temperatura cercana a la ambiente y en sequedad, son similares a las condiciones de almacenamiento de alimentos e ingredientes constituidos por aceites microencapsulados, y por tanto proporcionan resultados sobre el desarrollo de la oxidación más fiables que los ensayos acelerados por elevada temperatura, luz o catalizadores. Con objeto de evitar cambios estructurales no deseados, la temperatura en los ensayos de almacenamiento fue inferior a los valores de T_g obtenidos para los aceites microencapsulados.

El muestreo se realizó por triplicado (una alícuota de cada desecador), y las muestras se conservaron a -32 °C hasta su análisis. La extracción y posterior análisis de las muestras se realizaron previa mezcla homogénea de las tres alícuotas. En determinados casos se analizaron las alícuotas por separado.

3.5.- METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS

3.5.1.- Extracción de la fracción de aceite libre

La extracción de la fracción de aceite libre o no encapsulado fue realizada como se detalla en el apartado 3.3.1.1.

3.5.2.- Extracción de la fracción de aceite encapsulado

La fracción encapsulada se obtuvo con ayuda de un mortero para romper la matriz y liberar el aceite encapsulado. El aceite liberado se recupera mediante extracción con hexano.

Procedimiento analítico:

A 10 g de microencapsulados se le adicionan 3 mL de agua desionizada y se macera en un mortero para la obtención de una masa. Se adicionan 5 g de Na_2SO_4 anhidro y se macera hasta la formación de una masa granular. A continuación se realizan tres extracciones con 70 mL de éter dietílico cada una. Después de filtrar los correspondientes extractos en papel de filtro conteniendo Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es eliminado por evaporación en un rotavapor a 55 °C. Finalmente, la muestra se lleva a peso constante utilizando una corriente de nitrógeno.

3.5.3- Extracción de la fracción total de aceite

La extracción de la fracción total de aceite fue realizada como se detalla en el apartado 3.3.1.2.

3.6.- EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

3.6.1- Índice de peróxidos

El índice de peróxidos se determinó mediante titulación iodométrica (AENOR, 1991). Se obtiene a partir del yodo liberado en la reacción de oxidación del yoduro potásico con los hidroperóxidos presentes en el aceite y se expresa como miliequivalentes (meq) de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de materia grasa.

Procedimiento analítico:

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, provisto de boca esmerilada y tapón de vidrio, se introduce la muestra de aceite que se desea ensayar. El peso de la muestra ensayada se selecciona según el índice de peróxidos aproximadamente esperado y que viene tabulado en la misma norma.

Se adicionan 25 mL de una mezcla ácido acético:cloroformo (3:2 v/v), en la cual se disuelve rápidamente la grasa por agitación, y por último se añade 1 mL de solución acuosa saturada de yoduro potásico.

Se cierra el matraz y se mantiene en agitación durante un minuto, conservándolo después en la oscuridad durante cinco minutos más, dejando así que la reacción transcurra y evitando la oxidación del yoduro por el oxígeno del aire, reacción catalizada por la luz, que podría introducir un error por exceso. Al cabo de este tiempo se detiene la reacción añadiendo 75 mL de agua destilada, se agita vigorosamente y se valora el yodo

liberado con una disolución de tiosulfato sódico previamente estandarizada, utilizando como indicador una disolución acuosa de almidón al 1% p/v.

El índice de peróxidos se calcula mediante la siguiente expresión:

$$IP \text{ (meq O}_2\text{ / kg aceite)} = \frac{V}{m} \frac{N}{1000}$$

donde:

V= mL de tiosulfato consumidos en la valoración

N= normalidad de la disolución de tiosulfato

m= gramos de grasa tomados para la determinación

3.6.2.- Determinación de polímeros

El análisis de dímeros y polímeros de triglicéridos se realizó de acuerdo al método normalizado por la IUPAC (IUPAC, 1992a).

Procedimiento analítico:

Se prepara una disolución del aceite en tetrahidrofurano (THF) de concentración 100 mg/mL y se analiza directamente mediante HPSEC con índice de refracción. Las condiciones cromatográficas aplicadas fueron las mismas que las utilizadas para el análisis de la fracción polar de aceites descritas en el apartado 3.3.11.

El análisis de muestras de aceites por cromatografía HPSEC permite la separación de cuatro grupos de compuestos que eluyen en orden inverso a sus pesos moleculares. Estos picos están formados, respectivamente, por oligómeros o polímeros de triglicéridos (OTG), dímeros de triglicéridos (DTG), monómeros de triglicéridos (TG) y un último grupo constituido por los ácidos grasos libres y la fracción insaponificable. Los oligómeros y dímeros de triglicéridos constituyen los compuestos de polimerización y son cuantificados conjuntamente como se indica a continuación:

$$Pol(\%) = \frac{A_{DTG} + A_{OTG}}{\sum A_i} 100$$

donde:

A_{DTG} es el área de los dímeros,

A_{OTG} , el área de los oligómeros, y

$\sum A_i$ la suma de las áreas de los cuatro picos

De acuerdo a la norma, se considera el mismo factor de respuesta para todos los picos y, por tanto, los polímeros son expresados como porcentaje en peso.

3.6.3.- Determinación de pérdida de sustrato

La determinación de la pérdida de sustrato se realizó mediante la cuantificación de los ésteres metílicos no oxidados mediante CG con ayuda de un patrón interno. El área de los picos de los isómeros del ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) se calculó en mg/g. La fracción de ésteres metílicos oxidados se cuantifica por diferencia ya que éstos no eluyen, quedando retenidos en la columna (Waltking, 1973).

Procedimiento analítico:

Se pesan 50 mg de muestra y se disuelven en 1 mL de solución de nonadecanoato de metilo (20 mg/ mL en hexano). Se preparan los ésteres metílicos con el mismo procedimiento analítico y se analizan en las condiciones cromatográficas detalladas en el apartado 3.3.10.

3.6.4.- Determinación de tocoferoles

El análisis cuantitativo de tocoferoles se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con la normativa IUPAC de determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales y grasas (IUPAC, 1992e).

Los tocoferoles de la materia grasa, disuelta en un disolvente orgánico y sin tratamiento previo, son separados individualmente mediante cromatografía HPLC en columna de sílice. La cuantificación de los mismos se realiza mediante calibración externa, usando soluciones de patrones de concentración conocida.

Procedimiento analítico:

En un vial se pesan aproximadamente 50 mg de aceite, se añade 1 mL de n-hexano, se agita y se analiza directamente por HPLC.

El análisis se llevó a cabo empleando un cromatógrafo provisto de un inyector Rheodyne 7725i (Waters, Milford, MA, USA), con un volumen de inyección de muestra de 20 μ L, una bomba HPLC Knauer 1200 (Knauer, Berlin, Alemania), una columna LiChrospher Si 60 (Agilent Technologies, Palo Alto, California) (25 x 0.4 cm d.i.), con

tamaño medio de partícula de 5 μm , y un detector de fluorescencia molecular Elite LaChrom L-2480 (Hitachi Hight Tech. Am., Schaumburg, Illinois USA). Se utilizó como fase móvil una solución de hexano – isopropanol 99:1 (v/v) a un flujo de 1 mL/min. Las longitudes de onda para la excitación y emisión fueron 290 y 330 nm, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- INFLUENCIA DEL TIPO DE MATRIZ Y DE LAS CONDICIONES DE PREPARACIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ACEITES MICROENCAPSULADOS

En este apartado se analiza el efecto del tipo de matriz, de las condiciones de elaboración de la emulsión y del método de secado sobre las propiedades fisicoquímicas de aceites microencapsulados. Se ha utilizado aceite de girasol y dos matrices de encapsulación distintas; por un lado, una matriz formada por caseinato sódico y lactosa, a la que llamaremos matriz láctea, y, por otro, una matriz constituida por maltodextrina, sacarosa y gelatina, a la que nos referiremos como matriz de maltodextrina. Las variables estudiadas en la elaboración de la emulsión han sido la presión de homogeneización y el número de pases; y como métodos de secado se han utilizado liofilización y atomización. Entre las propiedades fisicoquímicas más apropiadas para la caracterización de aceites microencapsulados se han analizado la eficacia de encapsulación, el tamaño de gotas de aceite, el tamaño de partículas de polvo, la actividad de agua, la temperatura de transición vítrea, la densidad, la solubilidad y el color (Drusch *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2010).

Con relación a las matrices, se han seleccionado dos matrices representativas de las más utilizadas en microencapsulación a partir de emulsiones naturales, como la leche, o formuladas.

En cuanto a los componentes de la matriz láctea, la lactosa y las proteínas de la leche se utilizan extensivamente como componentes de aceites microencapsulados y constituyen la matriz de productos lácteos deshidratados, obtenidos a partir de la leche, como la leche en polvo, o de emulsiones formuladas, como las fórmulas infantiles (Kelly, 2006). La lactosa es muy utilizada en atomización por su sabor y olor neutros, alta solubilidad y baja viscosidad, y se usa normalmente en combinación con proteínas de la leche. Aunque pueden utilizarse proteínas del suero de la leche, las caseínas y caseinatos presentan mayores ventajas debido a sus propiedades tensioactivas, que los convierten en agentes encapsulantes de alto poder emulsificante. Con diferencia, el caseinato sódico destaca como el más utilizado de la familia de caseínas y caseinatos por sus propiedades tensioactivas y mayor resistencia a la desnaturalización (Vega y Roos, 2006).

La matriz de maltodextrina fue seleccionada por ser una matriz con elevada estabilidad estructural (Orlien *et al.*, 2000) y por ser muy similar a la utilizada en numerosos ingredientes alimentarios (Drusch y Mannino, 2009). La sacarosa es sin duda el azúcar de uso más extendido en la industria alimentaria y es muy eficiente para encapsular volátiles. Sin embargo, no se utiliza sola, sino en combinación con lactosa o hidratos de carbono de elevado peso molecular como las maltodextrinas, el almidón o

diferentes tipos de almidón modificado. Las maltodextrinas, productos de hidrólisis del almidón con equivalente de dextrosa inferior o igual a 20, son muy utilizadas para microencapsulación a pesar de su pobre capacidad emulsificante, debido a su bajo coste, baja viscosidad a elevadas concentraciones y carácter insípido. Se utilizan frecuentemente en combinación con compuestos de menor peso molecular para favorecer la continuidad estructural durante la formación de la película encapsulante, mejorando con ello la eficacia de encapsulación de aceites. La estabilidad de emulsiones con componentes como las maltodextrinas y sacarosa requiere la incorporación de un emulsionante efectivo. De acuerdo con estudios realizados por otros autores, en esta Tesis se ha utilizado gelatina bovina, una proteína hidrosoluble derivada del colágeno, que ha sido empleada como emulsionante en diferentes formulaciones (Shahidi y Han 1993, Orlie *et al.*, 2000).

Los métodos de secado seleccionados -atomización y liofilización- son los más utilizados en la industria alimentaria (Matsuno y Adachi, 1993). La atomización es el proceso más económico y flexible, y consiste en la dispersión o nebulización de la emulsión en una cámara de secado, donde una corriente de aire caliente se encarga de evaporar el agua en un espacio de tiempo muy corto. La liofilización es el método de secado más apropiado para materiales sensibles al calor y también para aromas, ya que se lleva a cabo en las condiciones de sublimación del hielo (baja temperatura y presión reducida). Aunque el periodo de secado es largo (aproximadamente 20 h), el método es simple y suave.

Con objeto de facilitar la discusión de los resultados, se presentan en primer lugar los resultados obtenidos en las muestras secadas por liofilización y, posteriormente, por atomización.

4.1.1.- Muestras liofilizadas

La preparación de las muestras se encuentra detallada en el apartado 3.2.2 de esta Tesis (Materiales y métodos). Todas las muestras fueron elaboradas a partir de una emulsión de aceite en agua con un 30% p/p de solutos, donde el aceite y los componentes de la matriz constituyeron el 10 y 20 %, respectivamente.

Se seleccionaron las presiones más extremas (15 y 70 MPa) que se pudieron conseguir con estabilidad en el homogeneizador de altas presiones disponible en el laboratorio, limitado con una presión de alimentación de sólo 450 kPa; y se aplicaron uno o dos pases.

4.1.1.1.- Eficacia de encapsulación

La **Tabla 4.1** muestra los resultados de distribución lipídica obtenidos en los aceites microencapsulados. Incluye las cantidades obtenidas de aceite total extraído (apartado 3.3.1.2), aceite libre (apartado 3.3.1.1), y los valores de eficacia de encapsulación calculados (apartado 3.3.1).

Tabla 4.1- Distribución lipídica en los aceites microencapsulados.

| Muestra | | Aceite extraído | | EE |
|---------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| Matriz | Pases x Presión (MPa) | Total (g/100 g MP) | Libre (g/100 g MP) | (g/100 g AT) |
| Láctea | 1 x 15 | 29,46 ± 0,01 | 15,30 ± 0,62 ^d | 48,1 ± 2,9 ^b |
| | 2 x 15 | 29,09 ± 0,82 | 19,38 ± 0,51 ^e | 33,4 ± 3,4 ^a |
| | 1 x 70 | 30,95 ± 0,11 | 11,99 ± 0,18 ^c | 61,2 ± 1,1 ^c |
| | 2 x 70 | 30,00 ± 0,51 | 10,22 ± 0,03 ^b | 65,9 ± 1,7 ^c |
| Maltodextrina | 1 x 15 | 28,71 ± 0,63 | 9,84 ± 0,41 ^b | 65,7 ± 3,8 ^c |
| | 2 x 15 | 30,07 ± 0,01 | 9,80 ± 0,36 ^b | 67,4 ± 2,8 ^c |
| | 1 x 70 | 28,29 ± 0,07 | 6,48 ± 0,18 ^a | 77,1 ± 2,3 ^d |
| | 2 x 70 | 29,60 ± 0,36 | 5,98 ± 0,01 ^a | 79,8 ± 1,2 ^d |

EE: eficacia de encapsulación; MP: muestra en polvo; AT: aceite total extraído

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se realizó análisis de varianza de un factor para la cantidad total de aceite, cantidad de aceite libre y la eficacia de encapsulación (EE), considerando independientemente 3 factores -tipo de matriz, presión de homogeneización o número de pases- y dos niveles.

Como era de esperar, ninguno de los 3 factores tuvo un efecto significativo sobre la cantidad total de aceite. Todas las muestras presentaron valores próximos al valor teórico (33,3 %), lo que indica una recuperación de aceite de aproximadamente el 100 %.

En cuanto al análisis estadístico de los valores de la cantidad de aceite libre y de la EE (**Tabla 4.2**), los resultados mostraron efecto significativo para el tipo de matriz y la presión de homogeneización, mientras que no se encontró un efecto significativo para el número de pases. Los valores de EE fueron más elevados para la matriz de maltodextrina y para la mayor presión de homogeneización aplicada.

Tabla 4.2- Análisis de varianza de un factor para los valores de la eficacia de encapsulación.

| Factor | Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Medias cuadráticas | F | p |
|----------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------|----------|
| Matriz | Inter-grupos | 2486,770 | 1 | 2486,770 | 22,159 | 0,000 |
| | Intra-grupos | 2468,939 | 22 | 112,225 | | |
| | Total | 4955,710 | 23 | | | |
| Presión | Inter-grupos | 1807,870 | 1 | 1807,870 | 12,635 | 0,002 |
| | Intra-grupos | 3147,839 | 22 | 143,084 | | |
| | Total | 4955,710 | 23 | | | |
| Pases | Inter-grupos | 12,184 | 1 | 12,184 | 0,054 | 0,818 |
| | Intra-grupos | 4943,526 | 22 | 224,706 | | |
| | Total | 4955,710 | 23 | | | |

F: Función estadística de Snedecor

p: Probabilidad

Por otra parte, en ensayos preliminares donde se prepararon muestras únicamente con homogeneizador de palas Ultraturrax, sin la posterior homogeneización a alta presión, los valores de EE fueron muy bajos para las muestras de matriz láctea ($19,8 \pm 4,2$) y también para las de maltodextrina ($14,7 \pm 5,2$).

Considerando como único factor las combinaciones tipo de matriz, presión de homogeneización y número de pases, el análisis de varianza de los valores de EE mostró que dicho factor tuvo un efecto significativo. Aplicando el test de Tukey se obtuvo una diferenciación significativa entre las medias obtenidas por los diferentes tratamientos (**Tabla 4.1**). Como se puede observar, para una misma matriz y un mismo valor de presión de homogeneización, no se encontraron en general diferencias significativas entre muestras con diferentes pases. Por otro lado, el análisis estadístico mostró una clara diferenciación entre las muestras de matriz láctea y de maltodextrina, y entre muestras elaboradas con diferentes presiones de homogeneización.

4.1.1.2.- Tamaño promedio de glóbulos de aceite y dispersión de tamaños

La medida de tamaños de glóbulos de aceite en los microencapsulados se realizó en la emulsión reconstituida en agua, como se indica en el apartado 3.3.2. En primer lugar, se utilizó una lente de 100 mm que permite medir en un rango de tamaños medios (0,2 - 180 μm). Se observó que las muestras de la matriz de maltodextrina presentaron una distribución de tamaños de gotas en un rango superior a las muestras de matriz láctea, que presentaron un máximo de frecuencias muy próximo al límite inferior de tamaños y una importante fracción de gotas con tamaños inferiores al rango de medida (**Figura 4.1**). En consecuencia, se planteó la necesidad de cambiar a una lente donde se pudieran medir tamaños menores, más apropiados para las muestras de matriz láctea, y se repitieron las medidas con una lente de 45 mm (0,05 - 80 μm) (**Figura 4.2**).

A diferencia de las muestras de matriz láctea, las muestras con matriz de maltodextrina presentaron una distribución de frecuencias bimodal. En diferentes estudios se ha observado que emulsiones reconstituidas en agua a partir de microencapsulados atomizados que contienen carbohidratos de bajo DE muestran distribuciones de tamaños bimodales. Algunos autores atribuyen la distribución bimodal observada en muestras atomizadas a gotas de aceite de mayor tamaño debido a la baja capacidad emulsionante de las maltodextrinas, o a gotas formadas por coalescencia durante el proceso de secado (Vega y Roos, 2006). Hansen y Flink (1977) observaron una distribución bimodal en muestras obtenidas por liofilización de ácido linoleico microencapsulado en una matriz de maltodextrina. Se obtuvieron diámetros promedios de gotas de aproximadamente 10 μm y, tras la reconstitución de la emulsión, se observaron dos rangos de tamaños muy diferentes; por un lado, gotas de 1-2 μm y, por otro, de aproximadamente 35 μm (Hansen y Flink, 1977). Otros autores han encontrado en emulsiones reconstituidas máximos de frecuencias en el rango de tamaños de las partículas de polvo cuando aumentaron el contenido de grasa total sobre materia seca del 20 al 75 %. Por tanto, resultó evidente que las partículas de mayor tamaño correspondían a partículas de polvo sin disolver. Este hecho fue atribuido a un elevado contenido de grasa libre en la superficie de las partículas, que dificulta el contacto entre la matriz y el agua (McNamee *et al.*, 1998).

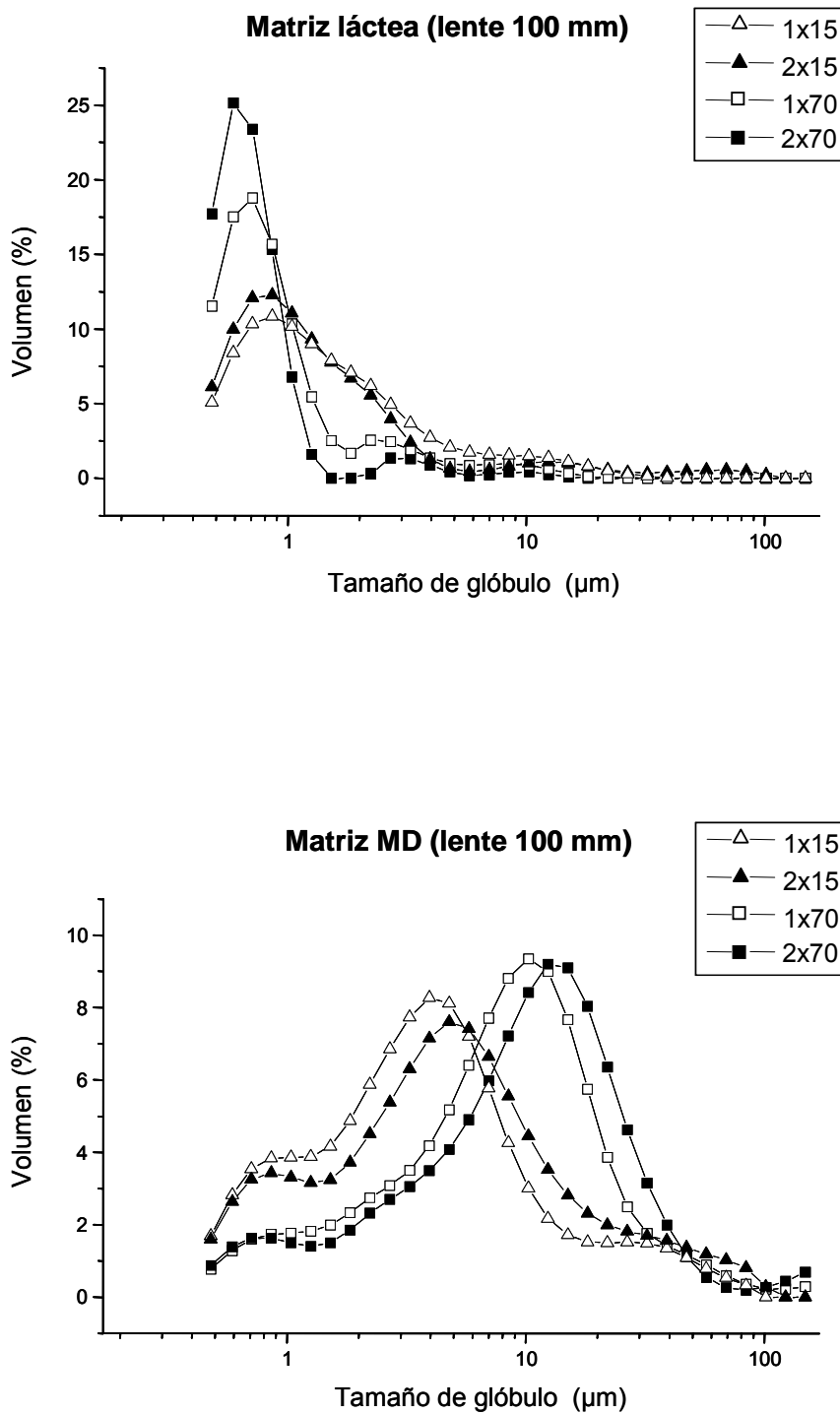


Figura 4.1- Distribución de tamaños de glóbulos de aceite en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo, medidas con la lente de 100 mm en un rango de 0,2 a 180 μm .

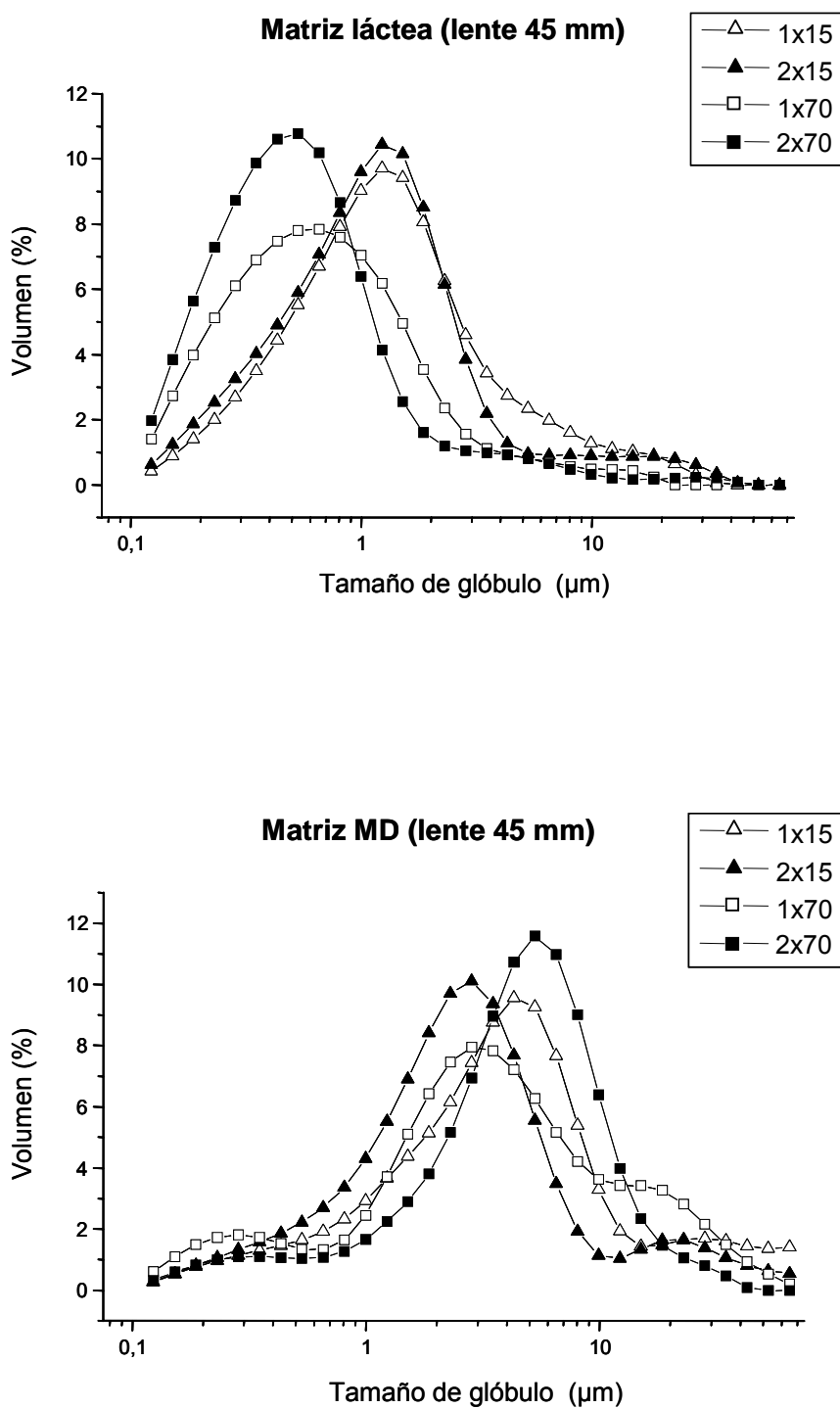


Figura 4.2- Distribución de tamaños de glóbulos en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo, medidas con la lente de 45 mm en un rango de 0,05 a 80 μm .

En esta Tesis, las muestras de matriz de maltodextrina sometidas a menor presión de homogeneización presentaron incluso un tercer máximo de frecuencias en la zona de tamaños más elevados. Este máximo podría estar relacionado con partículas de polvo sin disolver, sin embargo, se hicieron pruebas adicionales prolongando el tiempo de redispersión y aplicando ultrasonidos en el baño del analizador de partículas y no se obtuvieron cambios significativos. Además, ese máximo desapareció en las muestras sometidas a mayor presión de homogeneización y, por tanto, se debe descartar la hipótesis de que la matriz no estuviera completamente disuelta.

En la **Tabla 4.3** se recogen los valores obtenidos con la lente de 45 mm. Se han incluido las determinaciones del diámetro promedio de gotas de aceite ($d_{(v, 0,5)}$), rango de diámetros de gotas ($d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$), el diámetro de Sauter ($D [3,2]$), que es inversamente proporcional a la superficie específica de las gotas, y el área de superficie específica (ASE), obtenida a partir del diámetro de Sauter ($ASE = 6 / D[3,2]$).

Tabla 4.3- Tamaños de gotas de aceite obtenidos en el rango 0,05 – 80 μm (lente 45 mm) en emulsiones reconstituidas en agua a partir del producto en polvo.

| Matriz | Pases x Presión (MPa) | $d_{(v, 0,5)}$ (μm) | $d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$ (μm) | $D [3,2]$ (μm) | ASE (μm^{-1}) |
|---------------|-----------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------|
| Láctea | 1 x 15 | $1,29 \pm 0,15^b$ | $5,54 \pm 0,04^c$ | $0,90 \pm 0,03^b$ | $6,67 \pm 0,22^d$ |
| | 2 x 15 | $1,18 \pm 0,20^b$ | $3,35 \pm 0,03^b$ | $0,86 \pm 0,03^b$ | $6,98 \pm 0,24^d$ |
| | 1 x 70 | $0,85 \pm 0,02^a$ | $3,47 \pm 0,06^b$ | $0,55 \pm 0,04^a$ | $10,95 \pm 0,80^e$ |
| | 2 x 70 | $0,60 \pm 0,05^a$ | $1,56 \pm 0,01^a$ | $0,50 \pm 0,05^a$ | $12,08 \pm 1,21^e$ |
| Maltodextrina | 1 x 15 | $4,23 \pm 0,01^e$ | $19,41 \pm 0,26^f$ | $1,85 \pm 0,01^d$ | $3,24 \pm 0,02^b$ |
| | 2 x 15 | $2,81 \pm 0,02^c$ | $12,42 \pm 0,56^e$ | $1,52 \pm 0,01^c$ | $3,95 \pm 0,03^c$ |
| | 1 x 70 | $3,77 \pm 0,04^d$ | $20,50 \pm 0,82^f$ | $1,48 \pm 0,02^c$ | $4,05 \pm 0,05^c$ |
| | 2 x 70 | $5,12 \pm 0,02^f$ | $11,25 \pm 0,45^d$ | $2,06 \pm 0,01^e$ | $2,91 \pm 0,01^a$ |

$d_{v,0,5}$: diámetro promedio de gotas de aceite.

$d_{(v,0,9)} - d_{(v,0,1)}$: rango de diámetros de gotas.

$D [3,2]$: diámetro de Sauter.

ASE: área de superficie específica.

Los resultados expresan la media \pm la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Considerando como único factor el tipo de matriz, el análisis de varianza de los valores del diámetro promedio de gotas de aceite, rango de diámetros de gotas y diámetro de Sauter mostró diferencias muy significativas ($p < 0,001$) para las tres variables. Las muestras de matriz láctea mostraron valores significativamente inferiores de los tres parámetros medidos. Por tanto, las emulsiones de las muestras lácteas estuvieron constituidas por gotas más pequeñas y con tamaños en un rango más estrecho que las muestras de matriz de maltodextrina. En consecuencia, para las mismas condiciones de homogeneización, el área de superficie específica fue del orden del doble o cuatro veces superior en las muestras de matriz láctea. En general, las muestras de matriz de maltodextrina presentaron gotas en un amplio rango de tamaños y, por tanto, mostraron una mayor polidispersión.

Asimismo, se realizó análisis de varianza de un factor de los valores de los tres parámetros medidos en ambos tipos de muestra por separado, láctea y de maltodextrina, considerando independientemente dos factores –presión de homogeneización o número de pases-. Los resultados del análisis estadístico se encuentran recogidos en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4- Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de varianza de un factor.

| Matriz | Factor | d_(v, 0,5) | d_(v, 0,9) – d_(v, 0,1) | D [3,2] |
|----------------------|----------------|-----------------------------|--|----------------|
| Láctea | Presión | 0,000 | 0,014 | 0,000 |
| | Pases | 0,336 | 0,007 | 0,701 |
| Maltodextrina | Presión | 0,061 | 0,989 | 0,587 |
| | Pases | 0,948 | 0,000 | 0,418 |

Como se puede observar, la presión de homogeneización ejerció en los tres parámetros estudiados un efecto significativo en las muestras de matriz láctea, mientras que no se encontró efecto significativo en las emulsiones preparadas a partir de las muestras de maltodextrina. Por tanto, al aumentar la presión de homogeneización en las muestras lácteas disminuyeron los valores del diámetro promedio de gotas, de la dispersión de tamaños y del diámetro de Sauter. Por otra parte, el número de pases sólo tuvo un efecto significativo sobre la dispersión de tamaños ($d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$) en ambos tipos de muestra, produciéndose una disminución significativa al pasar de 1 a 2 pases. Por consiguiente, el número de pases dio lugar a una disminución de las gotas de mayor tamaño.

Los únicos resultados previos encontrados en microencapsulados con matriz láctea obtenidos por liofilización muestran igualmente que el tamaño promedio de gotas y la dispersión de tamaños disminuyeron al aplicar 3 x 40 MPa frente a 1 x 10 MPa (Heinzelmann *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en muestras de similar matriz láctea obtenidas por atomización han mostrado igualmente que al aumentar la presión de homogeneización disminuyó el diámetro promedio de gotas y al aumentar el número de pases disminuyó el rango de diámetros (Fäldt y Bergenstahl, 1996; Keogh *et al.*, 2001). Por otra parte, no se han encontrado referencias de estudios donde se evalúe el efecto de las condiciones de homogeneización en el tamaño de gotas en emulsiones preparadas a partir de microencapsulados con matriz de maltodextrina.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen claramente de manifiesto la mayor capacidad emulsificante del caseinato sódico en las muestras de matriz láctea, frente a la gelatina en las muestras de matriz de maltodextrina. Los resultados hallados en emulsiones preparadas a partir de las muestras de maltodextrina sugieren que el emulsionante no fue capaz de estabilizar con eficacia las gotas de aceite, ya que no se encontró un efecto significativo cuando se aumentó la presión de homogeneización. Este hecho podría estar relacionado no sólo con la menor capacidad emulsificante de la gelatina frente al caseinato sódico, sino también con la baja proporción de gelatina en la formulación frente al elevado contenido de caseinato sódico en las muestras de matriz láctea.

El tamaño de gotas de aceite está relacionado con la eficacia de encapsulación porque teóricamente un aumento en el área superficial de las gotas implica un mayor contacto y, por tanto, recubrimiento por la matriz por unidad de volumen de aceite. En diferentes estudios se ha observado una disminución en el tamaño de gotas y, a su vez, un aumento en la EE con la presión de homogeneización (Keogh *et al.*, 2001; Rusli *et al.*, 2006), mientras que en otros se han obtenido resultados variables (Heinzelmann *et al.*, 2000; Vignolles *et al.*, 2007).

En este trabajo, las muestras con matriz láctea presentaron valores de EE inferiores a los encontrados en las muestras de matriz de maltodextrina. Sin embargo, las primeras estuvieron constituidas por gotas de menor tamaño y concentradas en un rango de tamaños más estrecho que proporcionaron valores de ASE de aproximadamente el doble o cuatro veces superiores a los hallados en las muestras de maltodextrina.

Estudios realizados por Buma en los años 70 (1971a, b) y posteriormente por Drusch y colaboradores (Drusch *et al.*, 2008) han mostrado que la fracción de aceite libre está formada por aceite en la superficie de la partícula, por gotas localizadas en las capas más externas de la matriz de encapsulación, por gotas de aceite próximas a poros que son

extraídas por capilaridad y, finalmente, por gotas accesibles al disolvente a través de los huecos o poros dejados por el aceite ya extraído. En consecuencia, la cantidad de aceite libre extraído y, a su vez, el valor de EE no sólo depende del aceite superficial, sino también de la porosidad y/o de la permeabilidad al disolvente de la matriz de encapsulación (Buma, 1971a). Algunos autores han sugerido que la polaridad de la matriz puede estar implicada en la cantidad de aceite libre. Matrices más hidrofílicas, constituidas por una mayor proporción de azúcares en muestras conteniendo proteínas lácteas, limitan la accesibilidad del disolvente de extracción (Young *et al.*, 1993a, b; Hogan *et al.*, 2001).

En este estudio se ha observado que los valores de ASE fueron consistentes con los valores de EE en las muestras lácteas, ya que el aumento en la presión de homogeneización aumentó significativamente ambas variables. Sin embargo, en las muestras de matriz de maltodextrina no se encontró un efecto significativo de la presión en el valor del diámetro de Sauter, y a su vez en el valor de ASE, mientras que sí hubo un aumento significativo de la EE con el aumento de presión. Por tanto, los resultados indican claramente que los valores de EE dependieron en mayor proporción de otras propiedades fisicoquímicas de la matriz de encapsulación, como por ejemplo, la porosidad o la permeabilidad al disolvente de extracción, que del tamaño de gotas de aceite. La mayor EE encontrada en la matriz de maltodextrina podría también estar relacionada con su mayor carácter hidrofílico, como se ha sugerido con otras matrices en otros estudios (Young *et al.*, 1993a, b; Hogan *et al.*, 2001). La matriz de maltodextrina estuvo constituida por un 95 % (p/p) de maltodextrina y sacarosa; mientras que el contenido de azúcares (lactosa) en la matriz láctea fue del 50 % p/p, estando constituido el 50 % restante por caseinato sódico, que proporciona un mayor carácter hidrofóbico (Hogan *et al.*, 2001).

4.1.1.3.- Tamaños de partículas de polvo

El tamaño de partículas de todas las muestras fue evaluado mediante granulometría (apartado 3.3.3), utilizando una tamizadora automática. Como era de esperar, la distribución de tamaños obtenida fue similar en todas las muestras, ya que, tras liofilización, las muestras fueron sometidas a molienda aplicando las mismas condiciones. En todas las muestras, la mayor parte de las partículas (68,5-74,3%) se encontró en el rango comprendido entre 200 y 315 μm , mientras que el 8,1-9,7% de las partículas mostraron tamaños superiores a 315 μm , y el 17,6-22,3% tamaños inferiores a 200 μm .

4.1.1.4.- Actividad de agua

La humedad es un factor esencial en los productos en polvo, como los aceites microencapsulados y, especialmente, en relación con su estabilidad estructural durante su almacenamiento.

La **Tabla 4.5** recoge los resultados obtenidos de la medida de actividad de agua (a_w) en los microencapsulados. No se encontraron efectos significativos del tipo de matriz ($p = 0,597$), presión de homogeneización ($p = 0,597$) o número de pases ($p = 0,056$) sobre los valores de a_w . Todas las muestras mostraron valores muy bajos, comprendidos entre 0,03 y 0,08.

Tabla 4.5- Actividad de agua de los aceites microencapsulados.

| Matriz | Pases x Presión (MPa) | T (°C) | a_w |
|----------------------|-----------------------|--------|--------------|
| Láctea | 1 x 15 | 21,6 | 0,04 ± 0,003 |
| | 2 x 15 | 21,6 | 0,04 ± 0,000 |
| | 1 x 70 | 21,7 | 0,06 ± 0,003 |
| | 2 x 70 | 21,9 | 0,06 ± 0,003 |
| Maltodextrina | 1 x 15 | 22,6 | 0,08 ± 0,010 |
| | 2 x 15 | 22,9 | 0,04 ± 0,006 |
| | 1 x 70 | 23,0 | 0,04 ± 0,003 |
| | 2 x 70 | 22,9 | 0,03 ± 0,007 |

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.

4.1.1.5.- Temperatura de transición vítrea

Se ha determinado la temperatura de transición vítrea (T_g) mediante el método más utilizado, la calorimetría diferencial de barrido (“Differential Scanning Calorimetry”, DSC), cuya ventaja principal frente a otros métodos es su capacidad de medir prácticamente todos los tipos de transición de estados con un buen control de la velocidad de calentamiento y de la temperatura de la muestra.

Tal y como se ha comentado en el apartado 1.1.3.4, la T_g determina a qué temperatura ocurre el cambio del estado vítreo (“glassy”) al gomoso (“rubbery”) en sólidos amorfos. El estado gomoso facilita la reacción con el oxígeno, mientras que el estado vítreo forma una estructura con mayor capacidad aislante y encapsulante porque hay menos espacio libre, estando ocupado éste por las cadenas de las macromoléculas de

polímeros. Por encima de la T_g se incrementa la entropía y la capacidad calorífica y se produce una disminución de la rigidez y la viscosidad del sistema. De acuerdo con la teoría de la transición vítrea, para aumentar la estabilidad oxidativa, las formulaciones deben ser diseñadas para obtener matrices con elevada T_g , que permita al sistema permanecer en el estado vítreo de máxima estabilidad estructural (Orlien *et al.*, 2000). En los ensayos de almacenamiento es esencial que la temperatura no supere a la T_g , ya que en el estado gomoso la movilidad del sistema es tan elevada que se producirían cambios estructurales no deseados, como la aglomeración de partículas, cristalización de azúcares, cambios en la distribución del aceite en las partículas, etc (Vega y Roos, 2006).

Las **Figuras 4.3** y **4.4** recogen todas las curvas DSC obtenidas para las muestras de microencapsulados con matriz láctea y de maltodextrina, respectivamente. Al comparar las curvas obtenidas con distinta matriz se observan claramente diferencias de cambios de flujo, mucho más pronunciadas para la matriz de maltodextrina.

Las muestras con matriz de maltodextrina presentaron claramente una transición vítrea, en cambio las muestras de matriz láctea mostraron sólo ligeros cambios de flujo. No obstante, se comprobó que dichos cambios correspondieron a una transición vítrea, ya que el proceso resultó ser reversible (figuras no mostradas). Como puede observarse, el cambio de flujo de calor se produjo a una temperatura superior en las muestras lácteas.

La **Tabla 4.6** recoge los valores de la temperatura de transición vítrea para todas las muestras de microencapsulados. El análisis de varianza de un factor mostró un efecto muy significativo ($p < 0,001$) del tipo de matriz sobre los valores de T_g , mientras que no se encontró efecto significativo de la presión de homogeneización ($p = 0,564$), ni del número de pases ($p = 0,872$). Los valores de T_g fueron significativamente inferiores en las muestras de matriz de maltodextrina (41-42 °C) frente a las muestras de matriz láctea (56-62 °C).

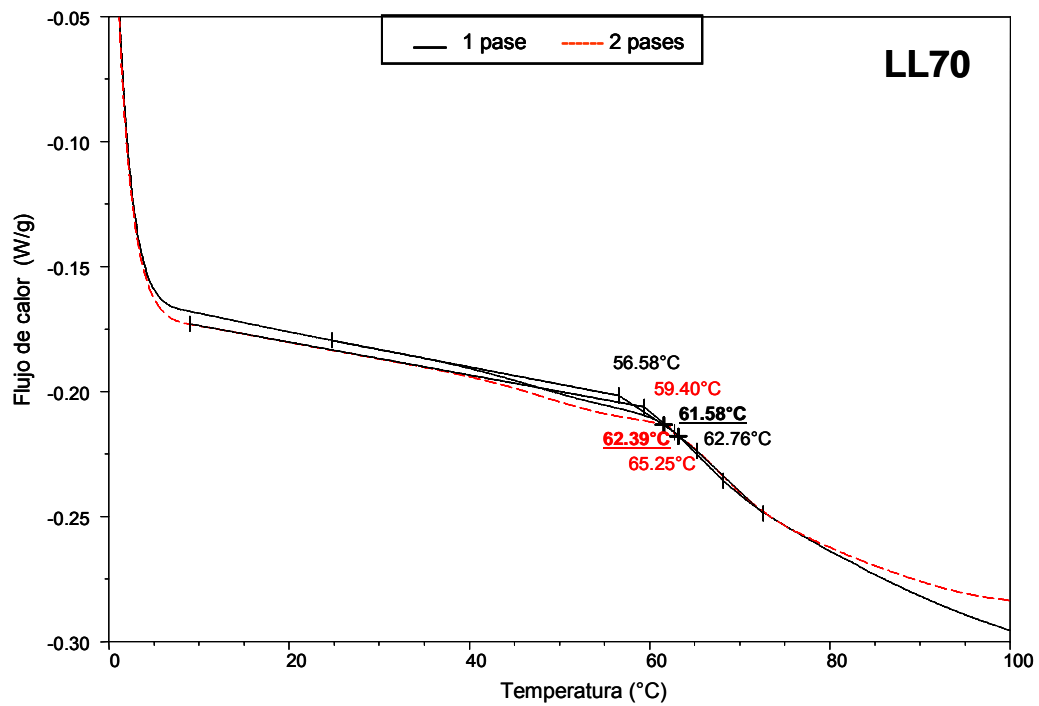
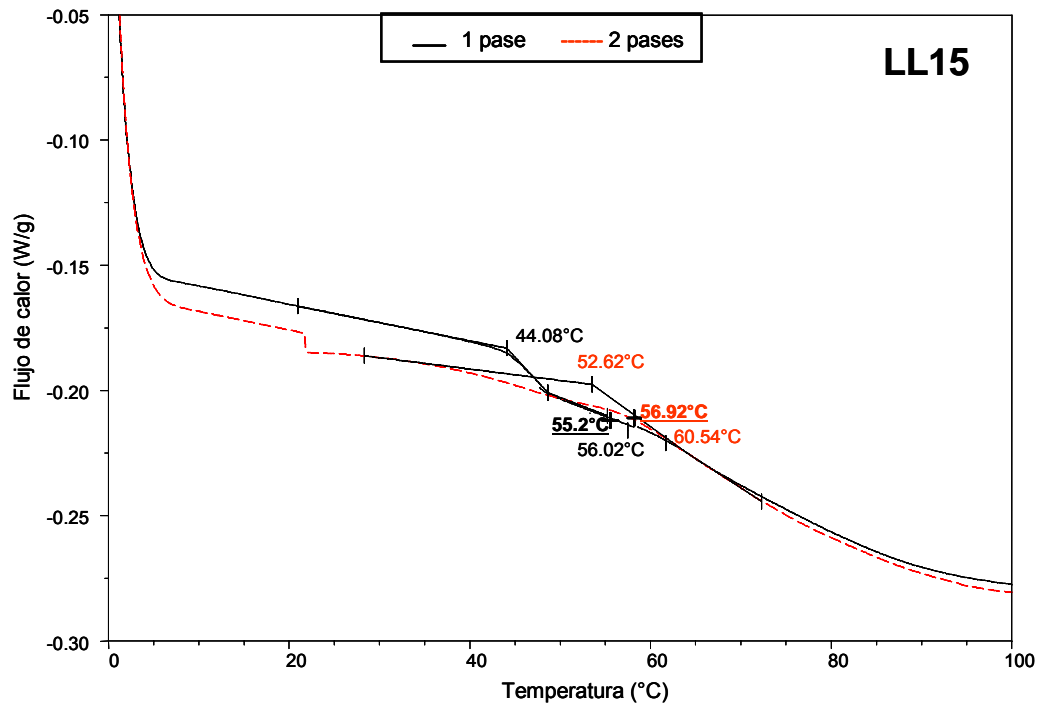


Figura 4.3- Curvas DSC encontradas en muestras de matriz láctea.

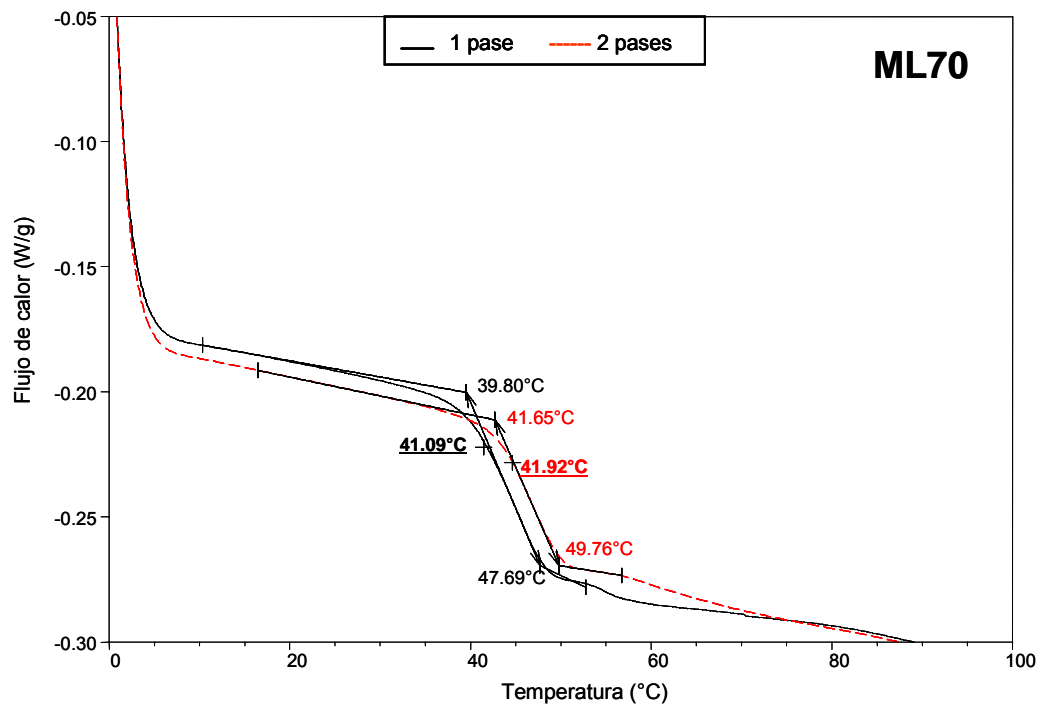
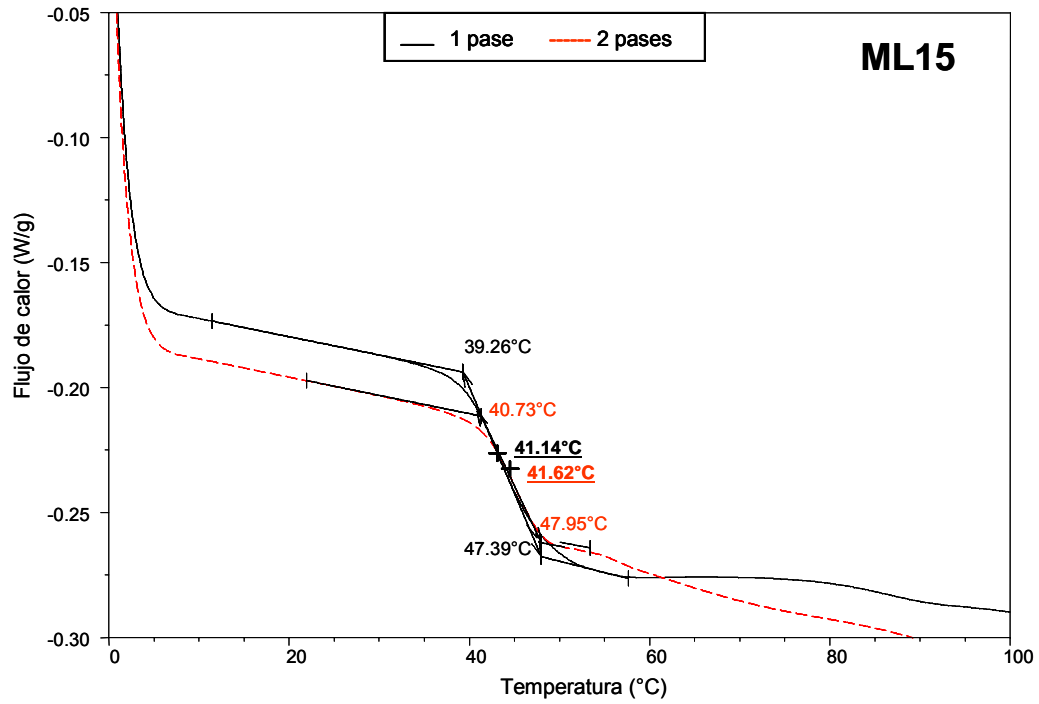


Figura 4.4- Curvas DSC encontradas en muestras de matriz de maltodextrina.

Tabla 4.6- Medidas de la temperatura de transición vítrea de los aceites microencapsulados.

| Matriz | Pases x Presión (MPa) | T _g (°C) |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Láctea | 1 x 15 | 55,8 ± 0,6 ^a |
| | 2 x 15 | 56,9 ± 0,1 ^a |
| | 1 x 70 | 61,5 ± 0,3 ^a |
| | 2 x 70 | 61,9 ± 0,5 ^a |
| Maltodextrina | 1 x 15 | 40,6 ± 0,5 ^b |
| | 2 x 15 | 41,1 ± 0,6 ^b |
| | 1 x 70 | 40,7 ± 0,4 ^b |
| | 2 x 70 | 41,8 ± 0,1 ^b |

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias muy significativas ($p < 0,001$).

La T_g de la lactosa amorfa pura es de 101 °C, uno de los valores más altos entre disacáridos anhidros. Se ha observado que la T_g de muestras de leche en polvo, obtenidas por atomización, depende de la T_g del hidrato de carbono mayoritario. Así, las transiciones vítreas observadas en muestras de leche en polvo, que contienen lactosa como principal azúcar, presentan T_g similares y muy cercanas a la de la lactosa pura (Thomas *et al.*, 2004). Sin embargo, si la lactosa es hidrolizada, la contribución de la galactosa y glucosa resultantes, con menores T_g, disminuye drásticamente la T_g de la leche en polvo. En el caso de muestras liofilizadas, no existen referencias en microencapsulados con composición similar a la utilizada en esta Tesis. En general, la actividad de agua ejerce una enorme influencia sobre T_g, disminuyendo esta última considerablemente con el contenido de humedad (Roos y Karel, 1991; Labrousse *et al.*, 1992; Grattard *et al.*, 2002). Como las muestras de microencapsulados preparadas en este estudio mostraron valores muy bajos y similares (**Tabla 4.5**), las diferencias de T_g observadas entre las muestras de matriz láctea y de maltodextrina no están relacionadas con diferencias de a_w.

Los menores valores de T_g encontrados para las muestras de maltodextrina (entre 15-20 °C de diferencia) indican que la matriz láctea es más estable desde el punto de vista estructural. La T_g de las maltodextrinas depende de su equivalente de dextrosa (DE) y se ha estimado que para maltodextrinas con DE de 10 liofilizadas, como la utilizada en esta Tesis, su valor se encuentra entre 160 y 103 °C para valores de actividad de agua comprendidos entre 0 y 0,1 (Roos y Karel, 1991). En muestras liofilizadas de mezclas de maltodextrinas con sacarosa, Roos y Karel (1991) observaron una reducción significativa

de Tg cuando aumentaron la proporción de sacarosa, cuyo Tg es de 57 °C. Para la mezcla de composición similar a la preparada en esta Tesis (aproximadamente sacarosa-maltodextrina 2:1) la Tg obtenida fue cercana a 65 °C. Sin embargo, es de esperar que los componentes adicionales, aceite y gelatina, en los microencapsulados preparados en el presente trabajo hayan contribuido a los menores valores de Tg obtenidos, aproximadamente de 41 °C. En un trabajo previo sobre microencapsulados preparados de forma similar, concretamente, con 45 % de sacarosa, 25 % maltodextrina, 5 % gelatina y 25 % de aceite, Orlie y colaboradores obtuvieron valores de Tg del mismo orden (49 °C) (Orlie *et al.*, 2000).

4.1.1.6.- Densidad a granel (“bulk density”)

Se realizaron medidas de volúmenes, como se indica en el apartado 3.3.6, a partir de las cuales se obtuvieron la densidad aireada (A) y la densidad empacada (P). La densidad aireada se determina permitiendo que el polvo se asiente en un recipiente bajo la influencia de la gravedad. Un polvo con fuerzas estructurales fuertes resiste el colapso cuando es dispersado en un contenedor, dando lugar a una densidad aireada baja. Sin embargo, un producto en polvo estructuralmente débil colapsa fácilmente y proporciona valores de densidad más elevados.

La densidad empacada se mide tras golpear el contenedor donde se encuentra el microencapsulado “aireado”. La estructura de un polvo con fuerte cohesión entre las partículas colapsa significativamente con los golpes, mientras que un microencapsulado con cohesión débil experimenta sólo un pequeño incremento hasta su consolidación. Las partículas de polvo son forzadas a saltar y a perder el contacto entre ellas con el movimiento; por tanto, cuando se reduce la fricción entre las partículas, se mejoran las condiciones de empaquetado. La diferencia entre la densidad aireada y empacada de los microencapsulados implica una alta tendencia hacia la fractura. La naturaleza quebradiza de la estructura puede tener influencia en las propiedades reológicas del producto en polvo.

Además, se calculó el contenido de aire intersticial, que es el aire que se encuentra entre las partículas (Westergaard, 1994; Vignolles *et al.*, 2009a):

$$\text{Contenido de aire intersticial} = (1 / A) - (1 / P) \quad (\text{mm}^3 / \text{g})$$

Los valores de la compresibilidad están estrechamente relacionados con los del volumen de aire intersticial y se calculan a partir de los valores de A y P. La compresibilidad refleja la capacidad de un material en polvo para ser compactado en un volumen pequeño y depende principalmente del tamaño de los huecos entre partículas. Se calcula a partir de la siguiente expresión (Kagami *et al.*, 2003):

$$\text{Compresibilidad (\%)} = (P - A) \times 100 / P$$

En la **Tabla 4.7** se recogen los valores de densidad y de contenido de aire intersticial obtenidos en las diferentes muestras de microencapsulados.

Tabla 4.7- Valores de densidad de los aceites microencapsulados y contenido de aire intersticial.

| Muestra | m (g) | v A (mL) | v P (mL) | A (kg/m ³) | P (kg/m ³) | Aire Intersticial (mm ³ /g) | Compresibilidad (%) |
|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|---------------------------|--|------------------------|
| Láctea 1 x 15 | 25,1 ± 0,03 | 66 ± 0,9 | 43 ± 0,3 | 378 ± 5,4 ^a | 587 ± 5,1 ^{ab} | 945 ± 27,5 ^{cd} | 36 ± 1,0 |
| Láctea 2 x 15 | 25,1 ± 0,03 | 64 ± 0,6 | 44 ± 0,3 | 392 ± 3,6 ^b | 575 ± 4,5 ^a | 810 ± 13,2 ^a | 32 ± 1,1 |
| Láctea 1 x 70 | 25,0 ± 0,01 | 63 ± 0,6 | 41 ± 0,3 | 397 ± 3,7 ^b | 616 ± 5,0 ^{cd} | 892 ± 35,4 ^{bc} | 36 ± 2,6 |
| Láctea 2 x 70 | 25,1 ± 0,03 | 60 ± 0,9 | 39 ± 0,6 | 421 ± 5,8 ^c | 644 ± 8,8 ^{ef} | 823 ± 12,5 ^{ab} | 34 ± 0,0 |
| MD 1 x 15 | 25,1 ± 0,01 | 63 ± 0,6 | 40 ± 0,3 | 399 ± 3,7 ^b | 634 ± 5,6 ^{de} | 928 ± 26,5 ^c | 38 ± 0,4 |
| MD 2 x 15 | 25,3 ± 0,21 | 68 ± 0,3 | 42 ± 0,3 | 374 ± 2,9 ^a | 597 ± 8,0 ^{bc} | 1002 ± 24,5 ^d | 37 ± 1,8 |
| MD 1 x 70 | 25,0 ± 0,01 | 58 ± 0,3 | 38 ± 0,6 | 429 ± 2,4 ^c | 659 ± 9,9 ^f | 812 ± 26,8 ^a | 34 ± 2,4 |
| MD 2 x 70 | 25,0 ± 0,01 | 58 ± 0,3 | 38 ± 0,3 | 429 ± 2,4 ^c | 653 ± 5,6 ^{ef} | 799 ± 23,0 ^a | 34 ± 3,6 |

v A: volumen aireado; v P: volumen empaquetado; A: densidad aireada; P: densidad empacada.

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de densidad aireada se encuentran en el rango de alimentos en polvo como la leche o fórmulas infantiles, con valores del orden de 400 kg/m³ para un contenido de humedad comprendido entre 2 y 4 % (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

Los resultados del análisis de varianza de un factor para los valores de A, P, aire intersticial y compresibilidad se encuentran recogidos en la **Tabla 4.8**. El tipo de matriz tuvo un efecto significativo sobre los valores de P, mientras que no se encontró un efecto significativo sobre los valores de A. En este sentido, la matriz de maltodextrina presentó valores más elevados de densidad empacada y, por tanto, se podría decir que ésta resultó ser una matriz con una mayor cohesión entre sus partículas que la matriz láctea. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de aire intersticial, ni en los valores de compresibilidad para los dos tipos de matriz. Por otra parte, la presión de homogeneización tuvo un efecto significativo sobre los valores de A, P y aire intersticial, pero no sobre el valor de compresibilidad. Los valores de densidad A y P aumentaron con la presión de homogeneización, y en mayor medida el valor de P. Como resultado, el

efecto contrario fue observado para el valor del aire intersticial. Por tanto, las muestras sometidas a mayor presión de homogeneización fueron más fáciles de compactar. Por otra parte, no se encontró efecto significativo del número de pases sobre ninguno de los parámetros estudiados.

Cuanto más compresible es un material, menos capacidad para fluir tiene. El límite entre un material granular (“free-flowing”) y un material en polvo (“non-free-flowing”) se establece alrededor del 20 % de compresibilidad (Carr, 1965). Los valores obtenidos para los microencapsulados preparados superaron el 20 %, así que pueden ser considerados polvos. En los polvos finos la cohesión se debe principalmente a interacciones entre las partículas como las fuerzas de Van der Waals, aunque otros factores, tales como efectos mecánicos de entrecruzamiento, podrían también desempeñar un papel importante, sobre todo en partículas irregulares, y no esféricas, como las obtenidas en muestras liofilizadas (Geldart *et al.*, 2009).

Tabla 4.8- Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de varianza de un factor para los valores de densidad a granel.

| Factor | A | P | Aire Intersticial | Compresibilidad |
|-----------------------------|----------|----------|--------------------------|------------------------|
| Matriz | 0,218 | 0,013 | 0,578 | 0,227 |
| Presión | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,227 |
| Pases | 0,714 | 0,603 | 0,257 | 0,085 |
| Matriz/Presión/Pases | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 |

A: densidad aireada; P: densidad empacada.

Los resultados obtenidos de densidad (P) están en concordancia con los valores de EE. De hecho, la EE fue más elevada en las muestras que presentaron valores ligeramente más altos de P, esto es, en las muestras de matriz de maltodextrina frente a las de matriz láctea y, por otro lado, en las muestras preparadas a la mayor presión de homogeneización. Aunque no se pueden establecer comparaciones directas entre la densidad a granel (“bulk”) y la densidad de partículas, dado el elevado número de variables que intervienen en la primera (tamaño de partícula, geometría e interacción entre partículas) (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005), los resultados de la cantidad de aceite libre, junto con los resultados del tamaño de gotas de aceite, parecen indicar que las muestras con menor densidad a granel presentaron una mayor permeabilidad al disolvente de extracción de la fracción de aceite libre.

4.1.1.7.- Color

Las medidas de color se realizaron como se detalla en el apartado 3.3.7 en el espacio de color $L^*a^*b^*$ (CIELAB). Donde L^* indica luminosidad mientras que a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad e indican direcciones de colores: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul.

La **Tabla 4.9** recoge los valores del espacio de color para cada una de las muestras. El análisis de varianza de un factor mostró un efecto muy significativo del tipo de matriz sobre los valores de L^* ($p < 0,001$) y sobre los valores de b^* ($p < 0,001$), mientras que no se encontró un efecto significativo sobre a^* ($p = 0,073$). En este sentido, la matriz de maltodextrina mostró valores de L^* más elevados que los de la matriz láctea, y lo contrario fue encontrado para los valores de b^* . Por otra parte, la presión de homogeneización también mostró un efecto significativo sobre L^* ($p < 0,01$), y también sobre los valores de a^* ($p < 0,001$); sin embargo, no se encontró un efecto significativo sobre b^* ($p = 0,507$). El valor de L^* aumentó con la presión de homogeneización, mientras que los valores de a^* disminuyeron con ésta. El número de pases, sin embargo, no mostró un efecto significativo sobre los parámetros estudiados.

Tabla 4.9- Valores de luminosidad y coordenadas de cromaticidad de los aceites microencapsulados.

| Muestra | $L^*(D65)$ | $a^*(D65)$ | $b^*(D65)$ |
|---------------|------------------|------------------|-----------------|
| Láctea 1 x 15 | $88,01 \pm 0,58$ | $-0,61 \pm 0,03$ | $6,95 \pm 0,22$ |
| Láctea 2 x 15 | $88,35 \pm 0,21$ | $-0,57 \pm 0,02$ | $7,10 \pm 0,20$ |
| Láctea 1 x 70 | $89,48 \pm 0,21$ | $-0,20 \pm 0,01$ | $6,44 \pm 0,05$ |
| Láctea 2 x 70 | $89,44 \pm 0,06$ | $-0,21 \pm 0,02$ | $6,35 \pm 0,01$ |
| MD 1 x 15 | $89,94 \pm 0,27$ | $-0,56 \pm 0,01$ | $4,38 \pm 0,13$ |
| MD 2 x 15 | $89,98 \pm 0,55$ | $-0,56 \pm 0,02$ | $4,04 \pm 0,15$ |
| MD 1 x 70 | $90,77 \pm 0,46$ | $-0,48 \pm 0,03$ | $4,21 \pm 0,14$ |
| MD 2 x 70 | $91,25 \pm 0,26$ | $-0,45 \pm 0,01$ | $3,98 \pm 0,05$ |

Los resultados expresan la media \pm la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Los valores de a^* y b^* en aceites microencapsulados dependen de la actividad de agua, los componentes de la matriz y el tiempo de almacenamiento (Jiménez *et al.*, 2008). En las muestras de leche en polvo se suelen determinar los valores de b^* y L^* iniciales y la evolución de los valores de la coordenada b^* durante la conservación y el

almacenamiento, que dependen de las condiciones utilizadas. Normalmente el valor de b^* en la leche entera en polvo aumenta con el tiempo de almacenamiento (Stapelfeldt *et al.*, 1997). La evolución del color se ha estudiado también en microencapsulados de caroteno en matriz de maltodextrina y se encontró que los parámetros L^* y a^* estaban relacionados con la retención de caroteno durante el almacenamiento (Desobry *et al.*, 1997, 1999).

4.1.1.8.- Solubilidad y pH

La solubilidad y el pH se midieron a partir de emulsiones reconstituidas en agua preparadas a partir de las muestras de microencapsulados. La solubilidad está relacionada con la dispersión de las partículas en agua con ayuda de una agitación ligera. Existen diferentes métodos para determinar la solubilidad de productos en polvo (Thomas *et al.*, 2004). Generalmente se determina mediante el índice de solubilidad, que mide el volumen de sedimentos y, por tanto, cuanto más elevado es el índice, menos soluble es el producto.

El procedimiento utilizado para medir la solubilidad en esta Tesis ha sido detallado en el apartado 3.3.8, siguiendo un método sencillo propuesto por Jiménez y colaboradores (Jiménez *et al.*, 2008). En la **Tabla 4.10** se recogen los valores referidos a los tiempos necesarios para alcanzar la solubilidad total de las muestras. Así mismo, se han incluido los valores de pH obtenidos.

Tabla 4.10- Tiempos necesarios para alcanzar la solubilidad (t) y valores de pH de las emulsiones reconstituidas.

| Muestra | t (s) | pH |
|---------------|-----------------|-------------------|
| Láctea 1 x 15 | $347 \pm 0,7^a$ | $6,72 \pm 0,07^a$ |
| Láctea 2 x 15 | $318 \pm 0,6^a$ | $6,68 \pm 0,05^a$ |
| Láctea 1 x 70 | $285 \pm 0,5^a$ | $6,70 \pm 0,07^a$ |
| Láctea 2 x 70 | $337 \pm 0,5^a$ | $6,69 \pm 0,08^a$ |
| MD 1 x 15 | $138 \pm 0,6^b$ | $5,09 \pm 0,06^b$ |
| MD 2 x 15 | $209 \pm 0,4^b$ | $5,11 \pm 0,09^b$ |
| MD 1 x 70 | $203 \pm 0,4^b$ | $5,10 \pm 0,08^b$ |
| MD 2 x 70 | $111 \pm 0,3^b$ | $5,05 \pm 0,07^b$ |

Los resultados expresan la media \pm la desviación estándar de la media de 3 muestras. Diferentes letras en cada columna indican diferencias muy significativas ($p < 0,001$).

El análisis de varianza de un factor mostró un efecto muy significativo del tipo de matriz sobre los valores de t ($p < 0,001$) y pH ($p < 0,001$). Las muestras con matriz de maltodextrina fueron más solubles que las de matriz láctea y las emulsiones reconstituidas

mostraron valores de pH ligeramente inferiores. Por otra parte, no se encontró un efecto significativo de la presión de homogeneización, o el número de pases, sobre la solubilidad y tampoco sobre los valores de pH.

En muestras de leche en polvo se han estudiado los factores que influyen en la solubilidad y se ha encontrado que la velocidad de disolución y la dispersibilidad disminuyen al aumentar la cantidad de aceite superficial, la cristalización parcial de la lactosa y el colapso de la estructura de la matriz que da lugar a una disminución del área superficial (Thomas *et al.*, 2004). En esta Tesis, el hecho de que las muestras de matriz láctea fueran menos solubles que las de matriz de maltodextrina podría estar relacionado con la mayor cantidad de aceite libre encontrado en las primeras (**Tabla 4.1**), ya que el aceite en la superficie de la partícula dificulta el contacto entre la matriz y el agua (McNamee *et al.*, 1998). Sin embargo, mientras que un aumento en la presión de homogeneización dio lugar a una disminución en la cantidad de aceite libre, no se encontró un efecto significativo sobre el valor de la solubilidad. Algunos autores han observado que las condiciones de homogeneización y el tamaño de partícula parecen tener mayor influencia en la solubilidad de la leche en polvo que el contenido de aceite superficial (Vignolles *et al.*, 2007). En el presente trabajo tampoco se han encontrado diferencias significativas en el tamaño de las partículas de polvo entre las muestras lácteas y las de maltodextrina.

Por otra parte, durante la preparación de muestras, la solubilidad del caseinato sódico en las muestras lácteas fue muy inferior a la de los componentes de la matriz de maltodextrina. Para la completa disolución del caseinato sódico en agua fue necesario aplicar agitación continua durante aproximadamente 24 h. Por tanto, en el presente trabajo la solubilidad parece estar más relacionada con la composición de las muestras que con sus características fisicoquímicas. En este sentido, el mayor carácter hidrofílico de la matriz de maltodextrina, comentado anteriormente, podría explicar las diferencias de solubilidad entre las dos matrices.

4.1.2.- Muestras atomizadas

La preparación de las muestras se encuentra detallada en el apartado 3.2.2 de esta Tesis. Para la obtención de las muestras atomizadas se prepararon emulsiones de aceite en agua con la misma composición utilizada en las muestras liofilizadas. Las condiciones de homogeneización seleccionadas fueron 70 MPa de presión y un solo pase.

En la **Tabla 4.11** se recogen los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las muestras atomizadas. Con fines comparativos, también se han incluido los resultados de las correspondientes muestras liofilizadas preparadas a partir de emulsiones elaboradas con las mismas condiciones de homogeneización.

La EE aumentó considerablemente en la muestra de matriz láctea obtenida mediante atomización (94,1 %) frente a la muestra liofilizada (61,2 %). Sin embargo, no se encontró un efecto significativo del procedimiento de secado sobre el valor de EE en la muestra de matriz de maltodextrina. Igualmente, utilizando matrices con maltodextrina con DE 25, Desobry y colaboradores han obtenido valores de EE similares para muestras liofilizadas (65 %) y atomizadas (62 %) (Desobry *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos para el tamaño y dispersión de tamaños de gotas muestran diferencias muy claras entre los dos tipos de matriz. Para la muestra láctea, el secado por atomización dio lugar a valores del tamaño promedio de glóbulos, dispersión de tamaños y diámetro de Sauter significativamente menores que los hallados en las muestras liofilizadas. Sin embargo, las muestras de matriz de maltodextrina presentaron valores muy superiores del tamaño promedio de glóbulos y de la dispersión de tamaños en las muestras atomizadas frente a las liofilizadas. De hecho, la desestabilización de la emulsión fue tan elevada que la medida en un rango superior de tamaños (0,2 - 180 μm), es decir con la lente de 100 mm, fue más apropiada. En las **Figuras 4.5 y 4.6** se ilustran las curvas de frecuencia de tamaños obtenidas con las lentes de 45 y 100 mm, respectivamente. Al igual que se observó en las muestras liofilizadas, la muestra con matriz de maltodextrina presentó una distribución de frecuencias bimodal. Como ya se ha comentado, otros autores han encontrado similares resultados en muestras atomizadas con matriz conteniendo maltodextrina (Hansen y Flink, 1977; Hogan *et al.*, 2001; Vega y Roos, 2006). Los resultados obtenidos muestran nuevamente la baja estabilidad de la emulsión de la matriz de maltodextrina y, por tanto, el bajo poder emulsificante de la gelatina frente al caseinato sódico. Se puede decir que el secado por atomización ejerció una gran desestabilización de la emulsión de las muestras de matriz de maltodextrina. Sin embargo, dicha desestabilización no tuvo un efecto significativo sobre la eficacia de encapsulación.

Tabla 4.11- Características fisicoquímicas de los aceites microencapsulados obtenidos mediante secado por liofilización y atomización. Condiciones de homogeneización: 1 x 70 MPa.

| | Matriz Láctea | | Matriz Maltodextrina | |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| | Liofilización | Atomización | Liofilización | Atomización |
| Distribución lipídica: | | | | |
| Aceite Total (g/100 g MP) | 30,97 ± 0,05 ^c | 32,32 ± 0,14 ^d | 28,29 ± 0,07 ^a | 29,19 ± 0,10 ^b |
| Aceite Libre (g/100 g MP) | 11,99 ± 0,07 ^d | 1,93 ± 0,08 ^a | 6,48 ± 0,18 ^c | 5,81 ± 0,12 ^b |
| EE (g/100g AT) | 61,2 ± 1,1 ^a | 94,1 ± 0,2 ^c | 77,1 ± 2,3 ^b | 80,1 ± 0,3 ^b |
| Tamaños de gotas: | | | | |
| | <i>Lente 45 mm</i> | <i>Lente 45 mm</i> | <i>Lente 45 mm</i> | <i>Lente 45 mm Lente 100 mm</i> |
| d _(v, 0,5) (µm) | 0,85 ± 0,02 ^b | 0,48 ± 0,02 ^a | 3,77 ± 0,04 ^c | 15,94 ± 0,08 ^d 9,39 ± 0,17 |
| d _(v, 0,9) - d _(v, 0,1) (µm) | 3,47 ± 0,06 ^b | 1,33 ± 0,15 ^a | 20,50 ± 0,82 ^c | 56,78 ± 0,30 ^d 28,61 ± 0,78 |
| D [3,2] (µm) | 0,55 ± 0,04 ^b | 0,40 ± 0,05 ^a | 1,48 ± 0,02 ^c | 1,76 ± 0,01 ^d 2,91 ± 0,15 |
| ASE (µm ⁻¹) | 10,95 ± 0,80 ^c | 15,16 ± 1,91 ^d | 4,05 ± 0,05 ^b | 3,41 ± 0,02 ^a 2,07 ± 0,11 |
| Actividad de agua, a_w | | | | |
| | 0,06 ± 0,003 ^b | 0,39 ± 0,005 ^d | 0,04 ± 0,003 ^a | 0,25 ± 0,003 ^c |
| Transición vítrea, Tg (°C) | | | | |
| | 61,5 ± 0,3 ^d | 50,3 ± 0,5 ^c | 40,7 ± 0,4 ^b | 37,8 ± 0,4 ^a |
| Parámetros de densidad: | | | | |
| A (kg/m ³) | 397 ± 3,7 ^c | 178 ± 1,6 ^a | 429 ± 2,4 ^d | 378 ± 3,7 ^b |
| P (kg/m ³) | 616 ± 5,0 ^b | 264 ± 4,9 ^a | 659 ± 9,9 ^c | 628 ± 13 ^b |
| Aire intersticial (mm ³ /g) | 892 ± 35 ^b | 1830 ± 20 ^d | 812 ± 27 ^a | 1053 ± 29 ^c |
| Compresibilidad (%) | 36 ± 2,6 ^{ab} | 33 ± 1,9 ^a | 34 ± 2,4 ^{ab} | 40 ± 2,4 ^c |
| Parámetros de color: | | | | |
| L*(D65) | 89,5 ± 0,21 ^a | 93,3 ± 0,52 ^c | 90,8 ± 0,46 ^b | 98,16 ± 0,41 ^d |
| a*(D65) | -0,20 ± 0,006 ^c | -0,19 ± 0,010 ^c | -0,48 ± 0,031 ^b | -1,13 ± 0,034 ^a |
| b*(D65) | 6,44 ± 0,05 ^c | 3,81 ± 0,05 ^a | 4,21 ± 0,14 ^b | 8,58 ± 0,21 ^d |
| Solubilidad, t (s) | | | | |
| | 285 ± 0,5 ^b | 612 ± 0,8 ^d | 203 ± 0,4 ^a | 370 ± 0,9 ^c |
| pH | | | | |
| | 6,7 ± 0,07 ^b | 6,9 ± 0,04 ^c | 5,1 ± 0,08 ^a | 7,2 ± 0,09 ^d |

MP: muestra en polvo; AT: aceite total extraído; EE: eficacia de encapsulación

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

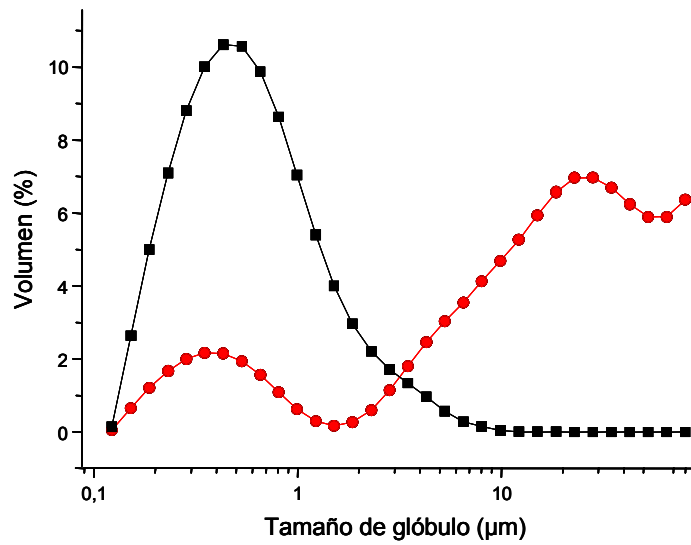


Figura 4.5- Distribución de tamaños de gotas de aceite en las muestras atomizadas con matriz láctea (-■-) y matriz de maltodextrina (-●-) con lente de 45 mm.

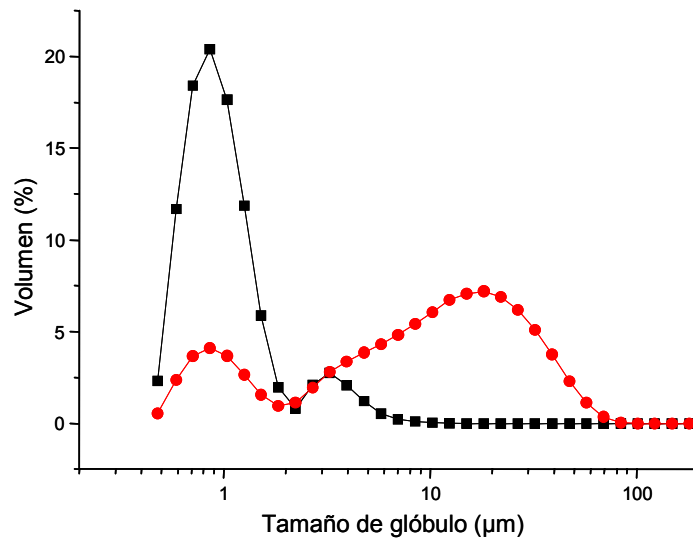


Figura 4.6- Distribución de tamaños de gotas de aceite en las muestras atomizadas con matriz láctea (-■-) y matriz de maltodextrina (-●-) con lente de 100 mm.

Las diferencias encontradas en el tamaño de gotas de aceite entre las muestras liofilizadas y atomizadas de matriz láctea son consistentes con la mayor cantidad de aceite libre en las primeras. En este sentido, la relación entre el tamaño de gotas y el contenido de aceite libre ha sido estudiada recientemente y se ha comprobado que las gotas de mayor tamaño son atribuidas mayoritariamente al aceite libre (Vignolles *et al.*, 2009b). Frente a la emulsión original antes de ser sometida a secado por liofilización, Hansen y Flink (1977) observaron gotas de tamaños más grandes en emulsiones reconstituidas a partir del producto en polvo; mientras que resultados similares a la emulsión original fueron encontrados en emulsiones reconstituidas a partir del producto en polvo tras eliminar la fracción de aceite libre. Para explicar este hecho, los autores sugirieron que las gotas aumentaron su tamaño mediante coalescencia durante la etapa de congelación. Por el contrario, cuando la congelación de la emulsión se realizó de forma rápida, mediante nitrógeno líquido, se observó una disminución de gotas en el rango de tamaños más grandes y una disminución del contenido de aceite libre. Por otra parte, la influencia de la molienda sobre el tamaño de gotas de aceite no ha sido estudiada y, por tanto, se desconoce si puede ser significativa. Parece razonable pensar que si durante la molienda se produce la rotura parcial de la interfase aceite-matriz, el aceite puede fluir sobre la superficie de la partícula formando depósitos discretos. En cualquier caso, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que el proceso de atomización parece conservar en mayor medida el tamaño y la distribución de tamaños de gotas de emulsiones estables que la liofilización seguida de molienda.

El valor de EE más elevado encontrado en la muestra atomizada de matriz láctea frente a la muestra liofilizada es coherente con un menor tamaño y una menor dispersión de tamaños de gotas en la primera. Por otra parte, es bien conocido que las muestras liofilizadas son más porosas que las muestras atomizadas (Sims, 1994), lo que implica una mayor penetración del disolvente de extracción y, por tanto, una mayor cantidad de aceite libre (Buma, 1971a).

Las muestras atomizadas presentaron valores de actividad de agua muy superiores (0,39 y 0,25 para las muestras de matriz láctea y de maltodextrina, respectivamente) a los encontrados en las muestras liofilizadas (0,04 - 0,06).

El valor de Tg de la muestra atomizada de maltodextrina fue muy inferior (aproximadamente 12 °C de diferencia) al encontrado para la muestra de matriz láctea, indicando nuevamente que la matriz de maltodextrina es más susceptible a cambios físicos en su estructura. Además, para ambas matrices, los valores de Tg fueron mucho más bajos que los de sus correspondientes muestras preparadas mediante liofilización. Aunque se ha comprobado que mezclas de caseinato sódico y lactosa muestran, para un mismo valor de actividad de agua, valores superiores de Tg en muestras liofilizadas que en

atomizadas (Haque y Roos, 2005, 2006), los resultados obtenidos en esta Tesis parecen estar más relacionados con el contenido de humedad. Los menores valores de T_g hallados para las muestras atomizadas pueden ser atribuidos al mayor contenido de humedad, como denotan los mayores valores de actividad de agua. En este sentido, es bien conocida la dependencia de la temperatura de transición vítrea con la actividad de agua (Fennema, 2000).

Con respecto a los parámetros de densidad, se observó un descenso muy significativo de A y P en las muestras atomizadas frente a las liofilizadas, y en mayor medida en la muestra de matriz láctea. En ambas muestras, de matriz láctea y de maltodextrina, los valores del aire intersticial fueron significativamente inferiores en las muestras atomizadas, lo que indica que la disminución de A con el método de secado fue mayor que la disminución de P . Como se ha comentado en el apartado anterior, los valores de densidad a granel no pueden compararse directamente con los valores de densidad de partículas. La primera no sólo depende de la segunda, sino también del grado de empaquetamiento entre las partículas, que a su vez depende del tamaño y forma de las partículas y de las interacciones entre las mismas, gobernadas estas últimas por numerosos factores (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005). Por tanto, la disminución observada de densidad a granel entre muestras liofilizadas y atomizadas, no puede ser atribuida directamente a un mayor volumen de aire ocluido en el interior de las partículas o a la porosidad de las mismas. De hecho, como se ha comentado anteriormente, las muestras liofilizadas son, en general, más porosas que las atomizadas (Sims, 1994).

En cuanto a la compresibilidad, no se hallaron diferencias significativas entre la muestra liofilizada y atomizada con matriz láctea, aunque se encontró un ligero aumento en la muestra atomizada frente a la liofilizada con matriz de maltodextrina.

Por otra parte, se encontró un aumento significativo del parámetro de color L^* en las muestras atomizadas con matriz láctea y de maltodextrina frente a sus correspondientes muestras liofilizadas. Asimismo, se produjo una disminución de la coordenada b^* en la muestra de matriz láctea, mientras que el efecto contrario fue hallado en la muestra con matriz de maltodextrina. El método de secado no tuvo un efecto significativo sobre el valor de la coordenada a^* en la muestra de matriz láctea, mientras que en la muestra de matriz de maltodextrina se encontró un aumento significativo en valor absoluto en la muestra atomizada frente a la liofilizada. Las diferencias de color entre las muestras atomizadas fueron apreciables, siendo las muestras de matriz láctea algo más blancas. El aumento hallado en la coordenada b^* en la muestra con matriz de maltodextrina indica la formación de productos de pardeamiento no enzimático debido a las elevadas temperaturas alcanzadas durante el proceso de atomización (Stapelfeldt *et al.*, 1997).

En relación con la solubilidad, al igual que se observó para las muestras liofilizadas, la muestra de maltodextrina fue mucho más soluble que la láctea, pero ambas fueron menos solubles que sus correspondientes muestras liofilizadas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Kim y colaboradores (2010), que compararon muestras liofilizadas y atomizadas de leche entera y observaron una mayor capacidad de rehidratación para las primeras. La mayor capacidad de rehidratación y solubilidad en agua puede ser atribuida a una mayor porosidad de la matriz de encapsulación (Sims, 1994; Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

En cuanto al pH, se observó un aumento significativo en las muestras atomizadas, y en mayor medida en la muestra de matriz de maltodextrina. Este hecho podría estar relacionado con la formación de productos de Maillard durante el secado, que mediante la medida del color resultó más evidente en la muestra de matriz de maltodextrina.

Por otra parte, no se pudo determinar el tamaño de partículas de las muestras atomizadas mediante granulometría, ya que el tamaño de las partículas fue tan pequeño que se producían interacciones de partículas en el primer tamiz de separación. Concretamente, se observaron fenómenos de aglomeración que resultaron en un aumento considerable de tamaño aparente. Aproximadamente la mitad de las partículas no atravesaron la primera criba, con luz de malla de 800 μm . Los ingredientes preparados por atomización se caracterizan por un tamaño de partícula pequeño (generalmente con diámetro inferior a 30 μm) (Matsuno y Adachi, 1993), que se analiza normalmente por difracción láser o por microscopía (Sootitantawat *et al.*, 2005; Janiszewska y Witrowa-Rejchert, 2009).

Finalmente, la aglomeración entre partículas observada en las muestras atomizadas puede estar relacionada con la menor densidad a granel hallada frente a las muestras liofilizadas, ya que una fuerte cohesividad entre partículas impide un elevado grado de empaquetamiento (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

4.1.3.- Evaluación conjunta de la influencia del tipo de matriz, presión de homogeneización y método de secado sobre las propiedades fisicoquímicas de aceites microencapsulados

El objetivo de este estudio consiste en identificar las principales diferencias en las propiedades fisicoquímicas introducidas por los tres factores estudiados en los apartados anteriores -tipo de matriz de encapsulación, presión de homogeneización y método de secado- de forma conjunta, es decir, analizando el conjunto total de datos. Para ello, se aplicó análisis de componentes principales, que, aprovechando interrelaciones entre variables, permite reducir considerablemente el número de variables dependientes mediante transformaciones ortogonales de las mismas. Como resultado, se obtiene un conjunto de variables incorreladas –componentes principales- que en orden decreciente de importancia explican la variabilidad del conjunto total de datos. Para este análisis se utilizó una matriz formada por 17 variables y 10 casos.

Variables: Cantidad de aceite libre (AL), eficacia de encapsulación (EE), tamaño promedio de gotas de aceite ($d_{(v, 0,5)}$), rango de tamaños de gotas ($d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$), momento de Sauter ($D_{[3,2]}$), área de superficie específica de gotas (ASE), actividad de agua (a_w), temperatura de transición vítrea (T_g), densidad aireada (A), densidad empacada (P), aire intersticial (AI), compresibilidad (C), parámetros de color (L^* , a^* y b^*), solubilidad (Sol) y pH.

Casos: LL1x15, LL2x15, LL1x70, LL2x70, LA1x70, ML1x15, ML2x15, ML1x70, ML2x70 y MA1x70; donde la primera inicial hace referencia al tipo de matriz, láctea (L) o de maltodextrina (M), la segunda al método de secado, liofilización (L) o atomización (A) y la numeración al número de pases por presión de homogeneización expresada en MPa.

Las dos primeras componentes principales obtenidas en el análisis representaron un 73 % de la varianza total, con un 39,6 % el Factor 1 y un 33,4 % el Factor 2. Como se puede ver en la **Figura 4.7A**, en el área definida por las dos primeras componentes se encontró una clara separación entre muestras con diferente matriz de encapsulación y entre muestras elaboradas con diferente método de secado. En este sentido, es evidente que el Factor 1 representa el tipo de matriz –láctea o de maltodextrina- y que el Factor 2 representa el método de secado, liofilización o atomización.

En la representación gráfica de los factores de carga (**Figura 4.7B**) podemos observar que las principales diferencias entre muestras con diferente matriz se encuentran en el diámetro de Sauter ($D_{[3,2]}$), o área de superficie específica de las gotas de aceite (ASE), los parámetros de densidad a granel (A y P) y la solubilidad (Sol). Por otra parte, las principales diferencias entre muestras obtenidas con diferente método de secado se

encuentran en la cantidad de aceite libre (AL), o eficacia de encapsulación (EE), y en el parámetro de color L^* .

Dadas las notables diferencias halladas entre las muestras con diferente matriz de encapsulación, se realizó un estudio de ambas matrices por separado. La eliminación de una variable independiente en el estudio permitió evaluar el efecto conjunto de las otras dos variables, presión de homogeneización y método de secado.

La **Figura 4.8** muestra los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales de las muestras con matriz láctea. Las dos primeras componentes principales obtenidas en el análisis representaron un 92 % de la varianza total, con un 73 % el Factor 1 y un 19 % el Factor 2. En el área definida por las dos primeras componentes se encontró una clara separación entre muestras preparadas con diferente presión de homogeneización y con diferente método de secado (**Figura 4.8A**). Sin embargo, la elevada variabilidad explicada por el Factor 1 no permite interpretar con claridad las dos primeras componentes principales. Como se observa en la **Figura 4.8B** todas las variables dependientes contribuyeron con un elevado factor de carga en el Factor 1 y aquellas que contribuyeron en mayor proporción en el Factor 2 también lo hicieron en la primera componente. Las variables que contribuyeron más en el Factor 2 fueron las relacionadas con el tamaño de gotas de aceite, $d_{(v, 0,5)}$, $d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$, $D [3,2]$ y ASE, y con el parámetro de color a^* . Examinando los resultados de todas las variables dependientes podemos observar que el aumento de presión de homogeneización tuvo un mayor efecto sobre el tamaño de gotas, $d_{(v, 0,5)}$, $d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)}$, $D [3,2]$ y ASE, y sobre el parámetro de color a^* que en el resto de las variables. Por otra parte, el método de secado también contribuyó significativamente en el valor de estas variables, aunque los cambios producidos fueron ligeramente inferiores en el tamaño de gotas de aceite y muy inferior en el parámetro de color a^* . Esto explica los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales, de forma que las variables dependientes arriba indicadas no son exclusivas de ninguna de las dos componentes. No obstante, se puede decir que el Factor 1 representa en gran medida el método de secado y que el Factor 2 representa en mayor proporción la presión de homogeneización. Por tanto, las principales diferencias entre muestras obtenidas con diferente método de secado estuvieron en todas las variables estudiadas con excepción del tamaño de gotas de aceite y el parámetro de color a^* , mientras que lo contrario se observa entre muestras preparadas con diferente presión de homogeneización. Así, el método de secado modificó en mayor medida las propiedades fisicoquímicas inherentes a la matriz de encapsulación, mientras que la presión de homogeneización tuvo un mayor efecto en el tamaño de gotas de aceite.

La **Figura 4.9** ilustra los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales de las muestras con matriz de maltodextrina. Las dos primeras componentes

representaron un 86 % de la varianza total, con un 61,6 % el Factor 1 y un 24,5 % el Factor 2. En el área definida por las dos primeras componentes se encontró una clara separación entre muestras preparadas con diferente presión de homogeneización y con diferente método de secado (**Figura 4.9A**). Resulta evidente que los Factores 1 y 2 representan, respectivamente, el método de secado y la presión de homogeneización. Nuevamente, al igual que lo encontrado en las muestras lácteas, el método de secado introdujo una mayor variabilidad en el conjunto total de datos que la presión de homogeneización. En la representación gráfica de los factores de carga (**Figura 4.9B**) se puede ver que las principales diferencias entre muestras elaboradas con diferente método de secado se encuentran en el diámetro promedio de gotas de aceite y la distribución de tamaños de gotas, la a_w y la T_g , los parámetros del color (L^* , a^* y b^*), la solubilidad y el pH. Por otra parte, las principales diferencias encontradas entre muestras elaboradas con diferente presión de homogeneización estuvieron en la cantidad de aceite libre (AL), o eficacia de encapsulación (EE), y los valores de densidad a granel (A y P).

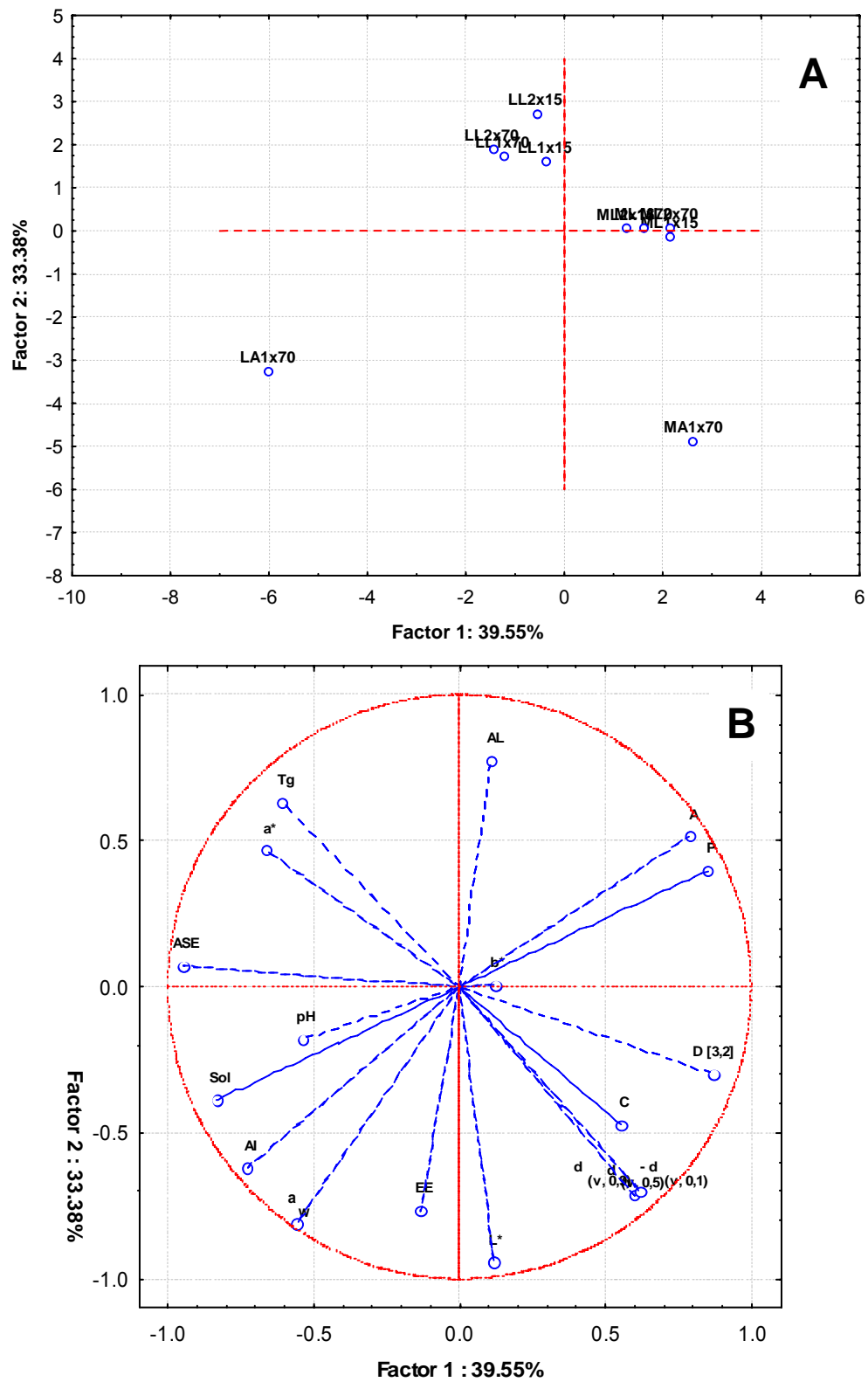


Figura 4.7- Análisis de componentes principales para el conjunto total de datos de la matriz formada por 17 variables y 10 casos. **A** Proyección de casos en el plano delimitado por las dos primeras componentes principales. **B** Representación gráfica de los factores de carga.

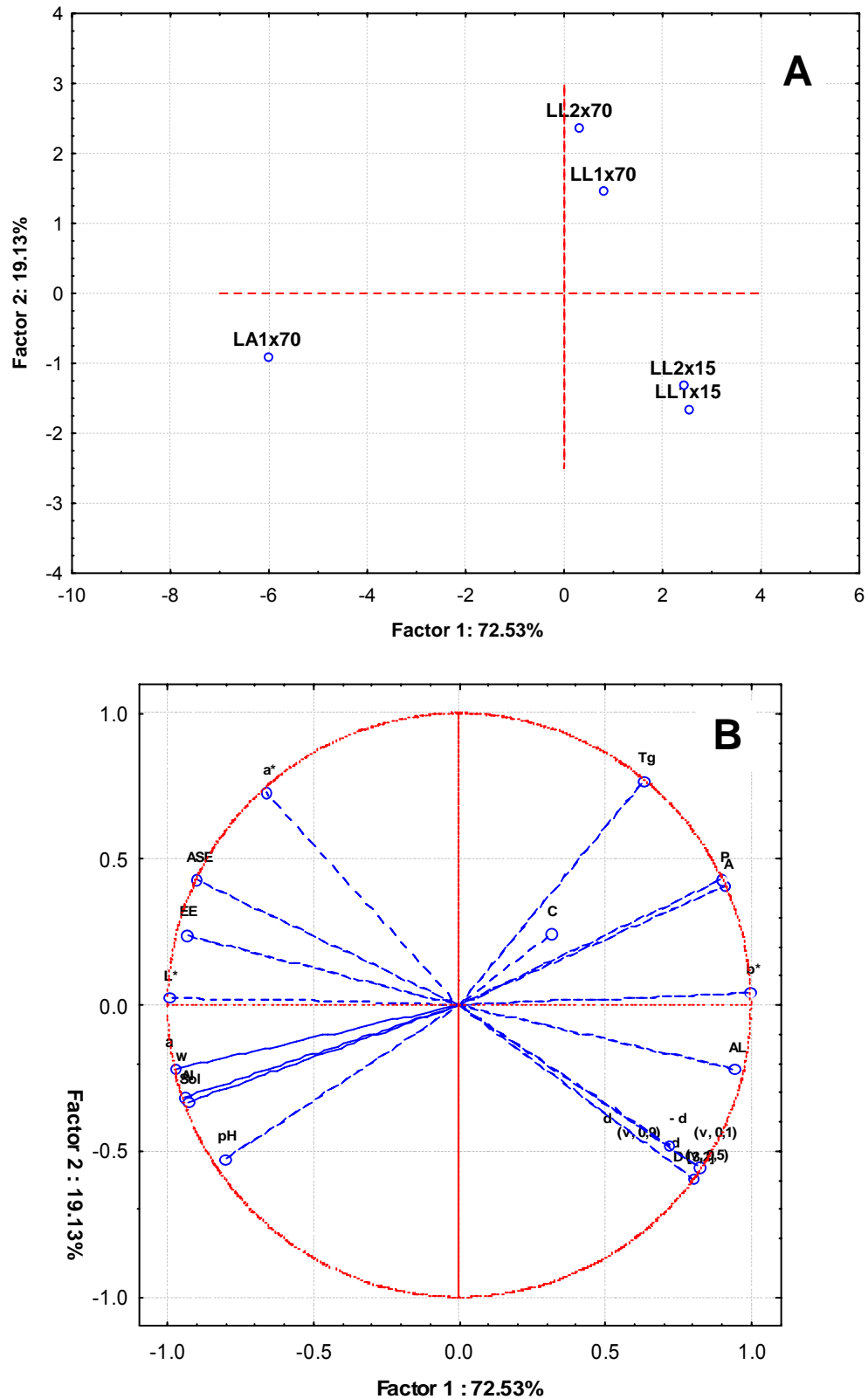
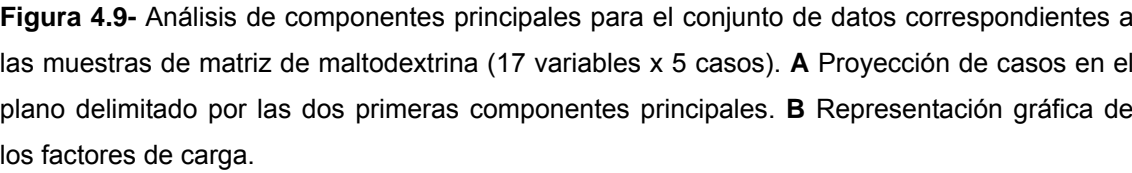


Figura 4.8- Análisis de componentes principales para el conjunto de datos correspondientes a las muestras lácteas (17 variables x 5 casos). **A** Proyección de casos en el plano delimitado por las dos primeras componentes principales. **B** Representación gráfica de los factores de carga.



Resumen de resultados:

Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros fisicoquímicos estudiados han mostrado diferencias significativas entre las muestras de matriz láctea y de maltodextrina. Con excepción del tamaño de partículas y de la actividad de agua en las muestras liofilizadas, que parecieron depender en mayor medida del grado de molienda y del tiempo de secado, respectivamente, se han encontrado diferencias significativas en todos los parámetros estudiados. Las principales diferencias entre muestras con diferente matriz de encapsulación fueron halladas en el diámetro de Sauter ($D[3,2]$), o área de superficie específica de las gotas de aceite (ASE), los parámetros de densidad a granel (A y P) y la solubilidad (Sol).

La matriz de maltodextrina se ha caracterizado por presentar en sus emulsiones reconstituidas en agua un mayor tamaño promedio y una mayor polidispersión de tamaños de gotas de aceite, lo que puede ser atribuido a que el emulsionante (gelatina) no fue tan efectivo como el de la matriz láctea (caseinato sódico). Como resultado, las emulsiones de la matriz de maltodextrina fueron mucho menos estables.

A pesar de que la fase dispersa presentó un valor más alto del área superficial (ASE), la EE de la matriz láctea (33,4 - 65,9 %) fue menor que la encontrada en la matriz de maltodextrina (65,7 - 79,8 %) en las muestras liofilizadas. Este hecho pone de manifiesto que la EE dependió en mayor proporción de otras propiedades fisicoquímicas de la matriz de encapsulación distintas al tamaño de gotas de aceite, como por ejemplo la porosidad, permeabilidad al disolvente de extracción y/o polaridad.

La matriz láctea presentó valores de T_g significativamente más altos (55,8 - 61,9 °C) que la matriz de maltodextrina (40,6 - 41,8 °C) para valores similares de actividad de agua, lo que indica que esta matriz es más estable frente a cambios físicos en su estructura. Por otra parte, la matriz láctea fue, independientemente del tipo de secado, menos soluble en agua que la matriz de maltodextrina.

En cuanto a la influencia de las condiciones de homogeneización, la presión ejerció en las muestras de matriz láctea un mayor efecto sobre el tamaño de gotas de aceite ($d_{(v, 0,5)}$, $d_{(v, 0,9)}$ - $d_{(v, 0,1)}$, $D[3,2]$ y ASE), disminuyendo con el aumento de la presión, que en el resto de propiedades estudiadas.

Sin embargo, no se encontró un efecto significativo de la presión de homogeneización en el tamaño de gotas de aceite en las muestras de matriz de maltodextrina, indicando que la gelatina no fue un emulsionante efectivo. A pesar de no ejercer un efecto significativo sobre el tamaño de gotas de aceite, la presión de homogeneización tuvo una gran influencia en la EE, aumentando considerablemente con

el aumento de presión. Las principales modificaciones introducidas por la presión en las muestras de matriz de maltodextrina se encontraron en la cantidad de aceite libre (AL), o EE, y también en los valores de densidad a granel (A y P).

Por otra parte, el número de pases sólo ejerció un efecto significativo sobre los tamaños de gotas de aceite. Concretamente, al pasar de uno a dos pases se encontró una disminución de la dispersión de tamaños de gotas; es decir, como era de esperar, una disminución de las gotas de mayor tamaño.

El procedimiento de secado ejerció un efecto muy significativo en prácticamente todas las propiedades fisicoquímicas estudiadas. La EE en las muestras con matriz de maltodextrina fue una excepción, ya que no se encontraron diferencias significativas entre la muestra liofilizada y atomizada. Sin embargo, el secado por atomización de la emulsión de la matriz láctea dio lugar a microencapsulados con una mayor EE (94,1 %) que la encontrada en la muestra liofilizada (61,2 %). En general, el método de secado introdujo una mayor variabilidad en el conjunto total de datos que la presión de homogeneización. De hecho, el Factor 1 en el análisis de componentes principales de los datos correspondientes a las muestras lácteas o de matriz de maltodextrina representó el método de secado, mientras que el Factor 2 representó la presión de homogeneización. En las muestras lácteas el método de secado tuvo una mayor influencia que la presión de homogeneización en todas las propiedades fisicoquímicas estudiadas, excepto en el tamaño de gotas de aceite y el parámetro de color a^* . Con respecto a las muestras de matriz de maltodextrina, las principales diferencias entre muestras obtenidas con diferente método de secado se encontraron en el tamaño de gotas de aceite, la a_w y la T_g , los parámetros de color (L^* , a^* y b^*), la solubilidad y el pH.

4.2.- OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS ELABORADOS EN EL LABORATORIO O EN PLANTA PILOTO

Con el objetivo de estudiar la influencia de las condiciones de preparación sobre el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados se han seleccionado muestras, elaboradas en nuestro laboratorio o en planta piloto (apartado 4.1.), con características fisicoquímicas claramente diferentes. Las muestras seleccionadas se describen en la **Tabla 4.12**.

Tabla 4.12 - Muestras de aceites de girasol microencapsulados seleccionadas para los estudios de oxidación.

| Matriz | Pases x Presión (MPa) | Método de secado | CLAVE |
|---------------|-----------------------|------------------|-------|
| Láctea | 1 x 15 | Liofilización | LL15 |
| | 1 x 70 | Liofilización | LL70 |
| | 1 x 70 | Atomización | LA70 |
| Maltodextrina | 1 x 15 | Liofilización | ML15 |
| | 1 x 70 | Liofilización | ML70 |
| | 1 x 70 | Atomización | MA70 |

La preparación de las muestras y sus características fisicoquímicas se encuentran detalladas en los apartados 3.2.2 y 4.1., respectivamente. La **Tabla 4.13** recoge los resultados correspondientes a la evaluación analítica del aceite de girasol utilizado para la elaboración de los aceites microencapsulados.

Tabla 4.13 - Caracterización del aceite de girasol utilizado en la elaboración de aceites microencapsulados.

| | Media | SD |
|---|-------|------|
| Composición en ácidos grasos (%) | | |
| C16:0 | 6,5 | 0,08 |
| C16:1 | 0,2 | 0,03 |
| C18:0 | 3,5 | 0,06 |
| C18:1 | 25,8 | 0,24 |
| C18:2 | 61,8 | 0,65 |
| C20:0 | 0,2 | 0,01 |
| C20:1 | 0,1 | 0,01 |
| C22:0 | 0,6 | 0,03 |
| C24:0 | 0,2 | 0,01 |
| Otros | 1,1 | 0,02 |
| Composición en tocoferoles (mg/kg) | | |
| Total | 891 | 12 |
| α -Tocoferol | 876 | 9 |
| β -Tocoferol | 13 | 0,7 |
| γ -Tocoferol | 2 | 0,1 |
| Índice de peróxidos (meq O₂/kg) | 3,0 | 0,12 |
| Estabilidad oxidativa en Rancimat a 100 °C (h) | 10,7 | 0,07 |

Los resultados expresan la media \pm la desviación estándar de 3 muestras.

El perfil de ácidos grasos corresponde al encontrado normalmente en aceites de girasol convencional, es decir, predomina en su composición el ácido linoleico, seguido del ácido oleico. Los tocoferoles son los antioxidantes mayoritarios en el aceite de girasol, fundamentalmente el α -Tocoferol. Los valores encontrados para el índice de peróxidos son los esperados para un aceite refinado (inferior a 10 meq O₂/kg). Por otro lado, la estabilidad oxidativa en Rancimat, que es la medida de la resistencia a la oxidación en condiciones aceleradas, también mostró un valor característico de estos aceites.

4.2.1.- Influencia del método de secado en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de almacenamiento realizados con muestras de distinta matriz (láctea o de maltodextrina), igual presión de homogeneización (70 MPa) y distinto método de secado (atomización o liofilización): LL70, LA70, ML70 y MA70 (**Tabla 4.12**).

Evaluación del estado de oxidación en las muestras iniciales

La **Tabla 4.14** recoge todos los parámetros analíticos indicadores del estado de oxidación en el aceite inicial y en los aceites microencapsulados. En las muestras de aceites microencapsulados se analizaron separadamente las fracciones de aceite libre y aceite encapsulado. El contenido en compuestos de oxidación se ha evaluado mediante el método desarrollado en nuestro laboratorio, que combina la extracción en fase sólida y la cromatografía líquida de exclusión molecular (HPSEC), y permite cuantificar los compuestos totales de oxidación no volátiles en 3 grupos (triglicéridos monómeros oxidados, dímeros y polímeros) y los compuestos de hidrólisis (diglicéridos y ácidos grasos libres) (Márquez-Ruiz *et al.*, 1996a). La suma de compuestos de oxidación e hidrólisis son los compuestos polares, llamados así por poseer mayor polaridad que los triglicéridos no alterados. Se determinó además el índice de peróxidos en todas las muestras. Así mismo, se han incluido el contenido total de tocoferoles y la estabilidad oxidativa en Rancimat, que para los aceites microencapsulados fue determinada directamente sobre las muestras de polvo.

Tabla 4.14 – Influencia del tipo de matriz y el método de secado sobre parámetros oxidativos e hidrolíticos en los aceites microencapsulados.

| Muestra | C.P. (% aceite) | Distribución de C.P. (% aceite) | | | | IP (meq O ₂ /kg aceite) | Tocoferoles (mg/kg) | Estabilidad Oxidativa* (h) |
|-----------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| | | Pol+Dim | TGMox | DG | AG | | | |
| Aceite Inicial | 4,9 | 0,7 ± 0,05 ^a | 2,4 ± 0,09 ^{bc} | 1,4 ± 0,08 ^a | 0,4 ± 0,01 ^b | 3,0 ± 0,12 ^a | 891 ± 12 ^d | 10,7 ± 0,07 ^d |
| LL70 LIB | 5,0 | 0,5 ± 0,06 ^a | 2,3 ± 0,13 ^{ab} | 1,5 ± 0,06 ^a | 0,6 ± 0,02 ^d | 4,3 ± 0,33 ^{bc} | 780 ± 18 ^c | 5,9 ± 0,06 ^a |
| LL70 ENC | 5,2 | 0,5 ± 0,07 ^a | 2,4 ± 0,11 ^{bc} | 1,4 ± 0,08 ^a | 0,7 ± 0,02 ^e | 5,1 ± 0,17 ^c | 737 ± 22 ^{bc} | |
| LA70 LIB | 5,0 | 0,4 ± 0,08 ^a | 2,6 ± 0,12 ^{bcd} | 1,4 ± 0,08 ^a | 0,5 ± 0,01 ^c | 6,2 ± 0,56 ^d | 650 ± 13 ^{ab} | 8,5 ± 0,07 ^c |
| LA70 ENC | 5,1 | 0,5 ± 0,07 ^a | 2,5 ± 0,14 ^{bc} | 1,3 ± 0,07 ^a | 0,6 ± 0,03 ^d | 3,9 ± 0,23 ^{ab} | 680 ± 16 ^a | |
| ML70 LIB | 4,9 | 1,0 ± 0,01 ^a | 2,9 ± 0,10 ^d | 1,4 ± 0,09 ^a | 0,4 ± 0,07 ^b | 13,6 ± 0,70 ^f | 631 ± 18 ^a | 8,1 ± 0,12 ^b |
| ML70 ENC | 4,7 | 1,0 ± 0,06 ^a | 2,3 ± 0,17 ^{ab} | 1,3 ± 0,08 ^a | 0,5 ± 0,02 ^c | 5,2 ± 0,55 ^c | 725 ± 22 ^a | |
| MA70 LIB | 4,2 | 0,5 ± 0,07 ^a | 2,7 ± 0,12 ^{cd} | 1,3 ± 0,02 ^a | 0,3 ± 0,01 ^a | 10,4 ± 0,83 ^e | 672 ± 16 ^a | 8,6 ± 0,09 ^c |
| MA70 ENC | 4,6 | 1,0 ± 0,07 ^a | 2,0 ± 0,03 ^a | 1,4 ± 0,05 ^a | 0,6 ± 0,02 ^d | 3,6 ± 0,32 ^{ab} | 740 ± 25 ^a | |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de la media de 3 muestras

LIB: fracción de aceite libre; ENC: fracción de aceite encapsulado; C.P.: Compuestos polares totales; Pol+Dim: Polímeros y dímeros de triglicéridos; TGMox: Triglicéridos monómeros oxidados; DG: Diglicéridos; AG: Ácidos grasos libres; IP: índice de peróxidos.

* La estabilidad oxidativa fue medida directamente en las muestras de polvo.

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05).

Los resultados obtenidos en el aceite muestran que los niveles de oxidación e hidrólisis son los encontrados comúnmente en aceites refinados (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2005). En general, no se observaron diferencias sustanciales en las cantidades de los compuestos de oxidación e hidrólisis entre los aceites microencapsulados y el aceite inicial. Sólo se encontraron valores ligeramente superiores de TGMox para la fracción de aceite libre de las muestras de maltodextrina, MA70 y ML70. El índice de peróxidos (IP) mostró, en general, valores más altos en los aceites microencapsulados. La fracción de aceite encapsulado en las muestras atomizadas constituyó una excepción, al no encontrarse diferencias significativas con respecto al valor del aceite inicial. Este hecho pone de manifiesto una mayor protección de la matriz de encapsulación durante el secado por atomización frente al secado por liofilización, donde el tiempo de operación constituye una de las principales diferencias entre ambos métodos. Los resultados de IP están de acuerdo con los obtenidos para TGMox, ya que los valores más altos fueron hallados en la fracción de aceite libre de las muestras de maltodextrina, MA70 y ML70. Por otra parte, se observaron pérdidas muy significativas de tocoferoles en todos los extractos, siendo aproximadamente del 15 % para la muestra LL70 y del 25 % para el resto de las muestras. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de tocoferoles entre las fracciones de aceite libre y encapsulado.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio se ha comprobado que los métodos de extracción seleccionados no modifican significativamente el nivel de oxidación de las muestras (Velasco *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos aquí demuestran que los procesos utilizados en la elaboración de las muestras no dieron lugar a la formación de cantidades sustanciales de compuestos de oxidación.

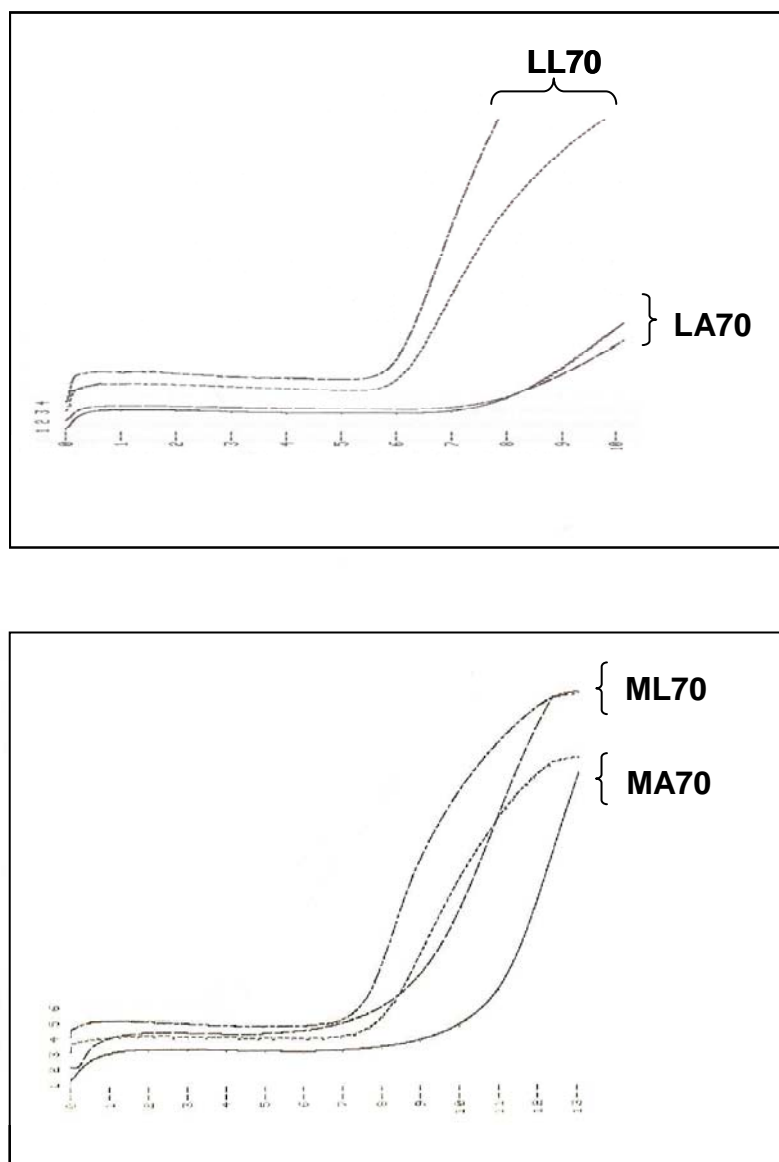


Figura 4.10 - Registros de la medida de estabilidad oxidativa en Rancimat a 100 °C (aumento de la conductividad, $\mu\text{S cm}^{-1}$, frente al tiempo, expresado en horas) correspondientes a aceites microencapsulados preparados a 70MPa: con matriz láctea obtenidos por liofilización (LL70) y atomización (LA70) y con matriz de maltodextrina obtenidos por liofilización (ML70) y atomización (MA70).

Con respecto al índice de estabilidad oxidativa, los valores encontrados para las muestras de microencapsulados fueron significativamente menores que el del aceite utilizado en la preparación de los mismos. La pérdida de estabilidad podría estar justificada por la disminución encontrada en el contenido de tocoferol, sin embargo, la enorme complejidad de estos productos no permite extraer conclusiones sobre la significación de los valores de estabilidad. Teóricamente, un aumento en el área superficial de la fase oleosa, como ocurre en los aceites microencapsulados frente a aceites en fase continua, da lugar a un mayor contacto con el oxígeno y, por tanto, a una mayor susceptibilidad a la oxidación. En estudios previos, se ha encontrado que los valores de estabilidad en Rancimat dependen en gran medida de la fracción de aceite libre, que es la fracción más expuesta al oxígeno y cuyos productos de oxidación volátiles pueden ser liberados y conducidos directamente a la celda de medida. Sin embargo, la cantidad de aceite libre debe ser lo suficientemente elevada como para proporcionar las curvas de respuesta usuales del test Rancimat (Velasco *et al.*, 2000b). En este sentido, no se pueden descartar cambios estructurales en la matriz de encapsulación durante el test que puedan originar cambios en la distribución de la fase oleosa, tales como la liberación de aceite en la superficie de la partícula (Shimada *et al.*, 1991; Labrousse *et al.*, 1992) o, por el contrario, fenómenos de reencapsulación o caking (Ponginebbi *et al.*, 2000; Hardas *et al.*, 2002), debido a que la temperatura de medida (100 °C) se encuentra muy por encima de los valores de Tg.

Con excepción de la muestra LL70, los valores de estabilidad de las muestras de microencapsulados fueron del mismo orden (**Tabla 4.14** y **Figura 4.10**). La muestra LL70 presentó un valor significativamente inferior, incluso cuando las pérdidas de tocoferoles fueron inferiores a las halladas en el resto de las muestras. Por otra parte, la muestra LL70 presentó un valor de la EE inferior (61,2 %) al de las muestras restantes (77,1 – 94,1 %), lo que significa un mayor contenido de aceite libre o fracción más expuesta al oxígeno. Sin embargo, los resultados de estabilidad no pueden ser atribuidos directamente a las diferencias en la EE o, más concretamente, a la cantidad de aceite libre, ya que, como se acaba de indicar, no se pueden descartar cambios estructurales en la matriz de encapsulación durante la medida. De hecho, no se han encontrado diferencias significativas en los valores de estabilidad oxidativa en Rancimat en muestras que fueron elaboradas bajo diferentes condiciones de homogeneización para obtener microencapsulados con un amplio rango de valores de EE (21 - 73 %) (Velasco *et al.*, 2000b).

4.2.1.1.- Comportamiento oxidativo del aceite de girasol (fase continua)

Con fines comparativos, se estudió el comportamiento oxidativo del aceite de girasol utilizado en la preparación de los aceites microencapsulados (**Figura 4.11**). Para ello, se han utilizado tres determinaciones complementarias: el índice de peróxidos (IP) (apartado 3.6.1), que permite evaluar la formación de los compuestos primarios de oxidación (Frankel, 2005), las cantidades de triglicéridos monómeros oxidados (TGMox), dímeros y polímeros (apartado 3.3.11), y la pérdida de antioxidantes, tocoferoles (apartado 3.6.4), cuya evolución constituye una indicación relevante de la cinética de oxidación (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003a). De forma similar a lo encontrado en trabajos anteriores del grupo (Martín-Polvillo *et al.*, 1996, 2000; Márquez-Ruiz *et al.*, 1999), se observó un aumento progresivo del IP y de los TGMox desde el inicio del ensayo, y los tocoferoles disminuyeron progresivamente hasta que su pérdida total marcó el final del periodo de inducción y el comienzo de la fase acelerada de oxidación, donde se inicia la polimerización. Al final del periodo de inducción (entre 65 y 75 días) se detectó claramente la rancidez oxidativa, los valores del IP estuvieron comprendidos entre 435 y 500 meq O_2 /kg aceite, y las cantidades de TGMox entre 2,0 y 2,7 %.

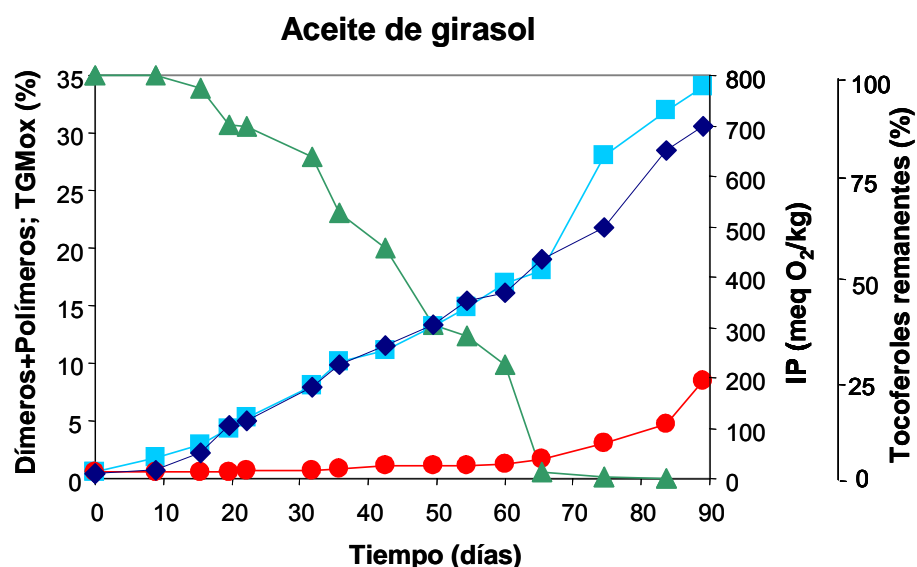


Figura 4.11 - Evolución de la oxidación en aceite de girasol a 30 °C y oscuridad. Índice de peróxidos (IP) (♦), Triglicéridos monómeros oxidados (TGMox) (■), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

Durante el periodo de inducción los TGMox están constituidos fundamentalmente por hidroperóxidos. De hecho, se encontró una excelente correlación lineal ($r^2 = 0,996$) entre las cantidades de TGMox y los valores de IP antes de la aceleración de la oxidación: $[TGMox] (\%) = 0,58 (\pm 0,09) + 0,046 (\pm 0,001) IP (\text{meq } O_2/\text{kg aceite})$. Estos resultados son similares a los encontrados por el grupo en otros estudios cinéticos de oxidación (Martín-Polvillo *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2006). En consecuencia, ambas determinaciones pueden utilizarse alternativamente.

Por otra parte, es necesario indicar que aunque la rancidez sea claramente detectable cuando se produce la pérdida total de los antioxidantes, ésta se pone de manifiesto a niveles de oxidación mucho más bajos, cuando la formación de compuestos secundarios supera los umbrales de percepción sensorial. Debido a que la liberación de compuestos volátiles responsables de la rancidez oxidativa depende de numerosos factores, no se puede establecer hasta qué nivel global de oxidación uno no esperaría encontrar indicios de rancidez. De hecho, debido a la gran variabilidad, no existen recomendaciones generales para descartar alimentos a partir de una base puramente analítica que no sea la del análisis sensorial. Una excepción la constituyen los aceites de fritura usados, para los cuales la legislación española limita el contenido de nuevos compuestos formados en un 25% en peso del aceite (BOE, 1989). Este hecho se debe a que los componentes volátiles son eliminados del aceite durante el calentamiento, y a que los compuestos de oxidación originados son responsables en parte del sabor y del olor del alimento frito tan apreciados por los consumidores. En general, se puede decir que en alimentos sometidos a temperatura ambiente o moderada, no es de esperar encontrar niveles de oxidación global superiores al 5 % en peso sobre materia grasa, ya que a estos niveles de oxidación la rancidez es fácilmente detectable (Márquez-Ruiz *et al.*, 1996b). Sin embargo, esto no significa que la rancidez oxidativa no pueda ser detectada incluso a niveles de oxidación inferiores.

4.2.1.2.- Comportamiento oxidativo del aceite de girasol encapsulado: muestras con matriz láctea

Para la evaluación de la oxidación de los aceites microencapsulados durante los ensayos de almacenamiento se han utilizado el IP (apartado 3.6.1), la cuantificación de dímeros y polímeros de triglicéridos mediante el análisis directo de los extractos de aceite por HPSEC (apartado 3.6.2) y la pérdida de tocoferoles (apartado 3.6.4).

La **Figura 4.12** muestra la evolución de la oxidación de la muestra LA70 hallada a partir del aceite total extraído, que es la fracción de aceite normalmente analizada en la mayoría de estudios sobre aceites microencapsulados.

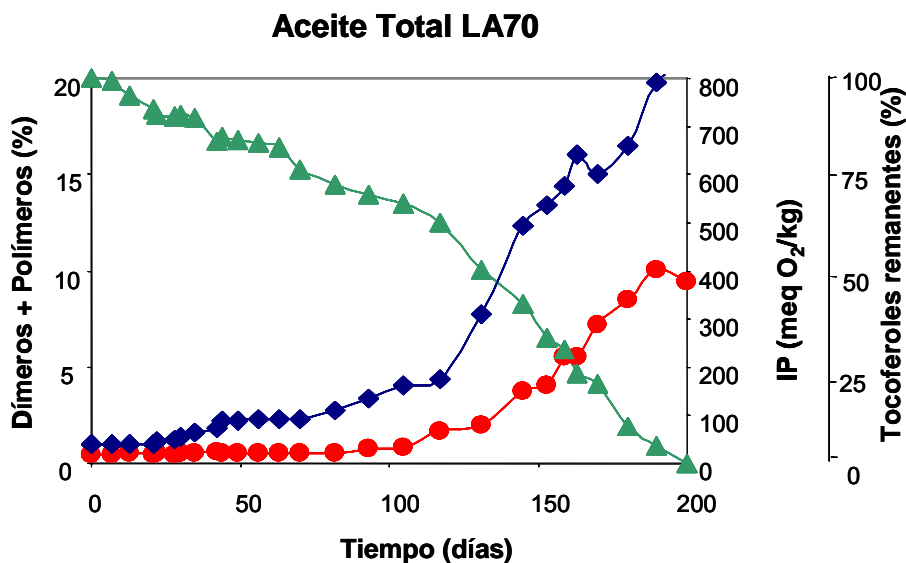


Figura 4.12 - Evolución de la oxidación en el aceite total extraído de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0% y oscuridad. Índice de peróxidos (IP) (♦), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

Los resultados muestran que el IP aumentó desde el inicio, y sólo a partir de 100 días se observó un incremento progresivo de los compuestos de polimerización. Sin embargo, a los 117 días, cuando la rancidez era claramente detectable en las muestras, el índice de peróxidos fue de 174 meq/kg, muy inferior al encontrado en las muestras del mismo aceite en fase continua (435 meq/kg) oxidado a la misma temperatura. Además, es necesario resaltar que antes de la pérdida total de tocoferoles se encontraron cantidades de compuestos de polimerización muy elevadas, cercanas al 10 %. Estos resultados son muy diferentes a los normalmente encontrados en aceites en fase continua, para los cuales se ha observado en numerosos estudios que la formación sustancial de compuestos poliméricos tiene lugar con la pérdida total de los antioxidantes (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2005).

Por otra parte, la evaluación de las fracciones de aceite libre y encapsulado por separado permitió explicar los resultados encontrados en la fracción total de aceite. Los resultados obtenidos para las diferentes muestras estudiadas han sido recogidos en tablas al final del apartado 4.2.1. (**Tablas 4.15- 4.18**)

La **Figura 4.13** ilustra el comportamiento oxidativo de las fracciones de aceite libre y encapsulado hallado en la muestra LA70. La pérdida total de tocoferoles en la fracción de aceite libre ocurrió, como era de esperar, cuando el índice de peróxidos alcanzó un valor elevado, concretamente de 480 meq/kg. Además, en ese punto comenzó la formación sustancial de compuestos de polimerización (final del periodo de inducción).

La oxidación de la fracción encapsulada fue más lenta, como se deduce del aumento del índice de peróxidos, del contenido de polímeros y de la pérdida de tocoferoles. Estos resultados, que ponen de manifiesto el carácter protector de la matriz de encapsulación, están de acuerdo con resultados obtenidos en estudios previos sobre muestras liofilizadas con la misma matriz y almacenadas bajo las mismas condiciones (Velasco *et al.*, 2009b).

El perfil de oxidación de la fracción encapsulada fue similar al del aceite total extraído (**Figura 4.12**), lo cual es razonable debido a que se trata de la fracción de aceite mayoritaria (94,1 % del aceite total). Este hecho indica que la oxidación más rápida de la fracción minoritaria (libre), responsable del olor a rancio, no fue detectada al analizar el aceite total, ya que los compuestos de oxidación de esta fracción fueron diluidos con la fracción mayoritaria, menos alterada. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, donde se detectó claramente la rancidez oxidativa en muestras comerciales de fórmulas infantiles en polvo que presentaron en el análisis del aceite total extraído, que es la práctica habitual, niveles de oxidación muy bajos (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003a). Por tanto, ninguno de los métodos aplicados al aceite total fue válido para explicar la rancidez de las muestras, lo cual es de extraordinaria importancia en la práctica, pues existe un gran número de ingredientes alimentarios y alimentos obtenidos por atomización a partir de emulsiones que presentan muy baja proporción de aceite libre.

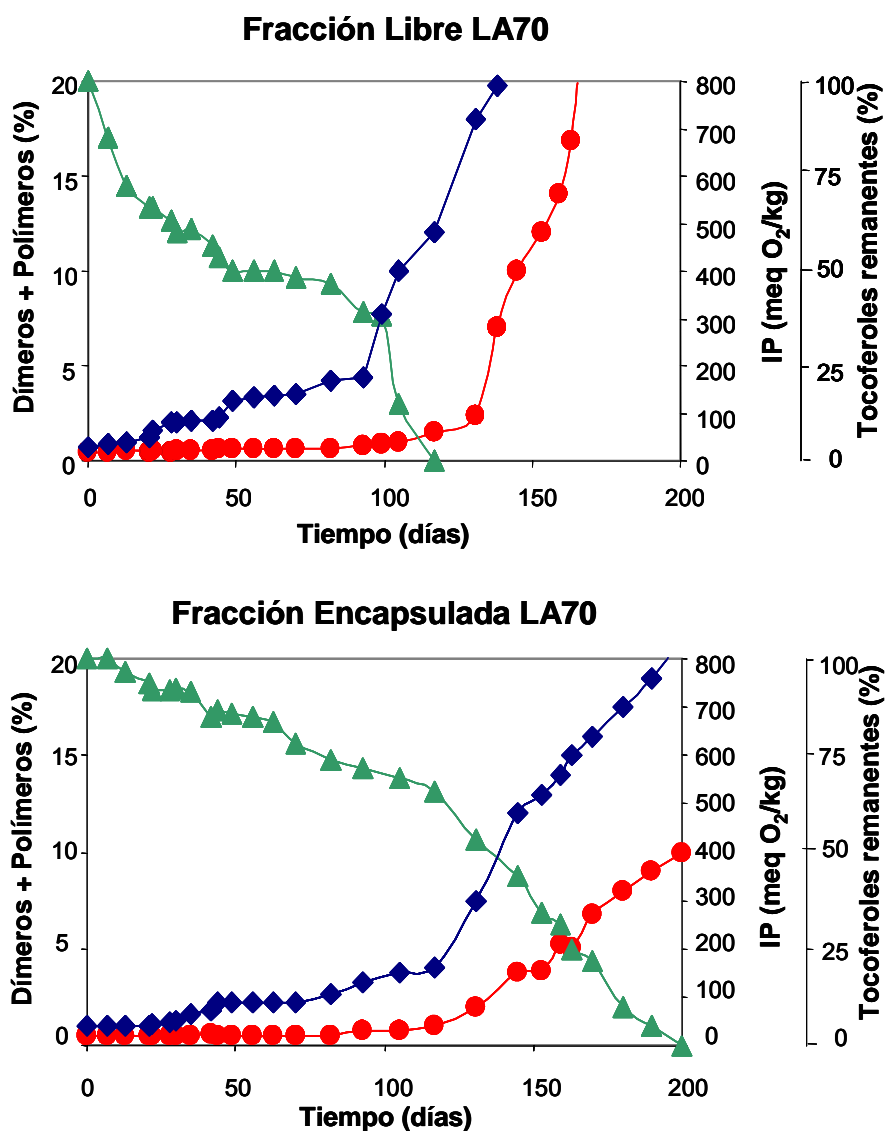


Figura 4.13- Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad.

Índice de peróxidos (IP) (♦), Dímeros+Polímeros (●) y Tocóferoles (▲).

A diferencia de lo encontrado en la fracción de aceite libre, la fracción de aceite encapsulado mostró cantidades muy elevadas de compuestos de polimerización en muestras que todavía contenían niveles relativamente elevados de tocoferoles. Por ejemplo, a los 170 días la fracción encapsulada presentó un 6,8 % de compuestos de polimerización y un 22 % del nivel inicial de tocoferoles. Para ilustrar este hecho, la **Figura 4.14** representa la relación entre el contenido de tocoferoles y las cantidades de dímeros y polímeros encontrada en las fracciones de aceite libre y encapsulado. Como se puede observar, aproximadamente a partir del 70 % de tocoferoles remanentes, la proporción de compuestos de polimerización formados con respecto al nivel de tocoferoles fue mucho más elevada en la fracción encapsulada que en la fracción de aceite libre. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en estudios realizados en nuestro laboratorio, donde se analizaron muestras liofilizadas con la misma matriz de encapsulación que la utilizada en las muestras lácteas de esta Tesis (Velasco *et al.*, 2006; 2009b). Los resultados obtenidos fueron atribuidos al carácter discontinuo de la oxidación en la fracción de aceite encapsulado. Mientras que la oxidación en la fracción libre se desarrolla de forma similar a aceites en fase continua, la oxidación de la fracción encapsulada tiene lugar en gotas de aceite independientes que se alteran a diferente velocidad. Como resultado, coexisten gotas con diferentes estadios de oxidación, que incluyen desde gotas de aceite poco oxidadas y con cantidades elevadas de tocoferoles hasta gotas en etapas de oxidación avanzada, ya desprovistas de tocoferoles y con cantidades significativas de los compuestos de oxidación avanzada (polímeros). Los resultados obtenidos en este estudio ponen, por tanto, de manifiesto que la fracción encapsulada de las muestras lácteas obtenidas por atomización presentan el mismo comportamiento oxidativo al encontrado en muestras liofilizadas.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la EE a lo largo de todo el periodo de almacenamiento, lo que indica que la matriz de encapsulación no sufrió cambios en su estructura que dieran lugar a cambios en la distribución del aceite.

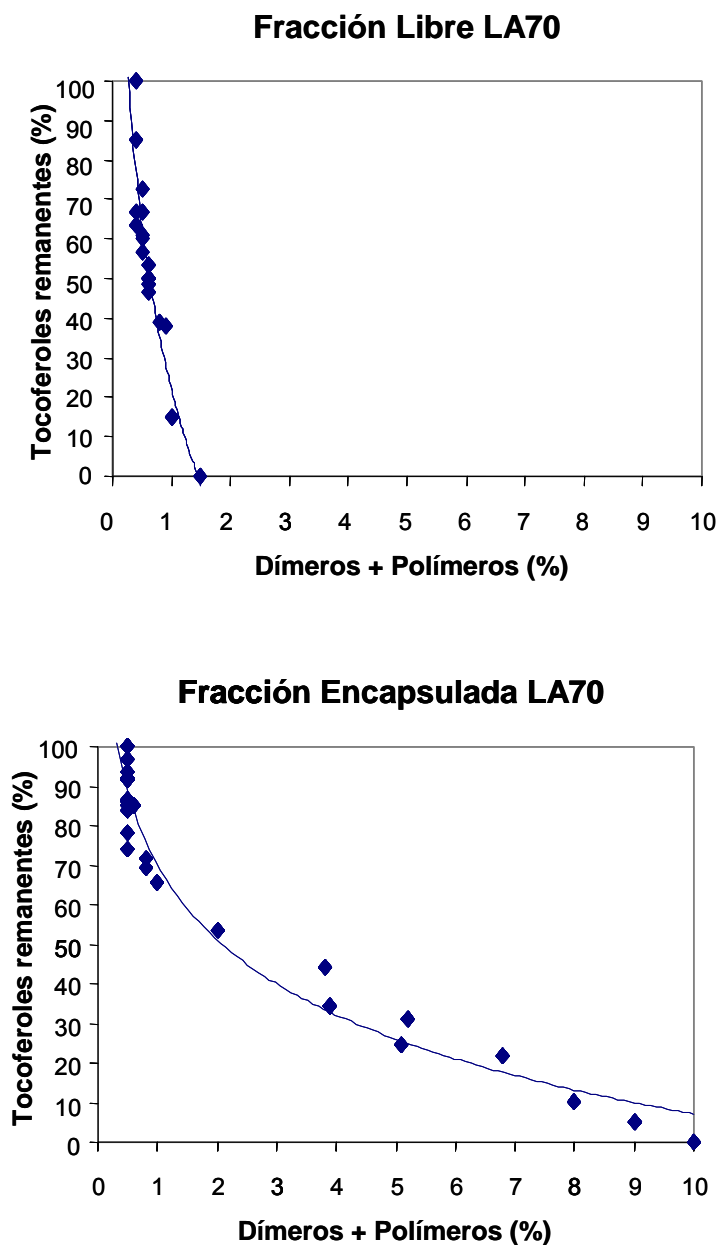


Figura 4.14 - Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LA70 sometida a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad.

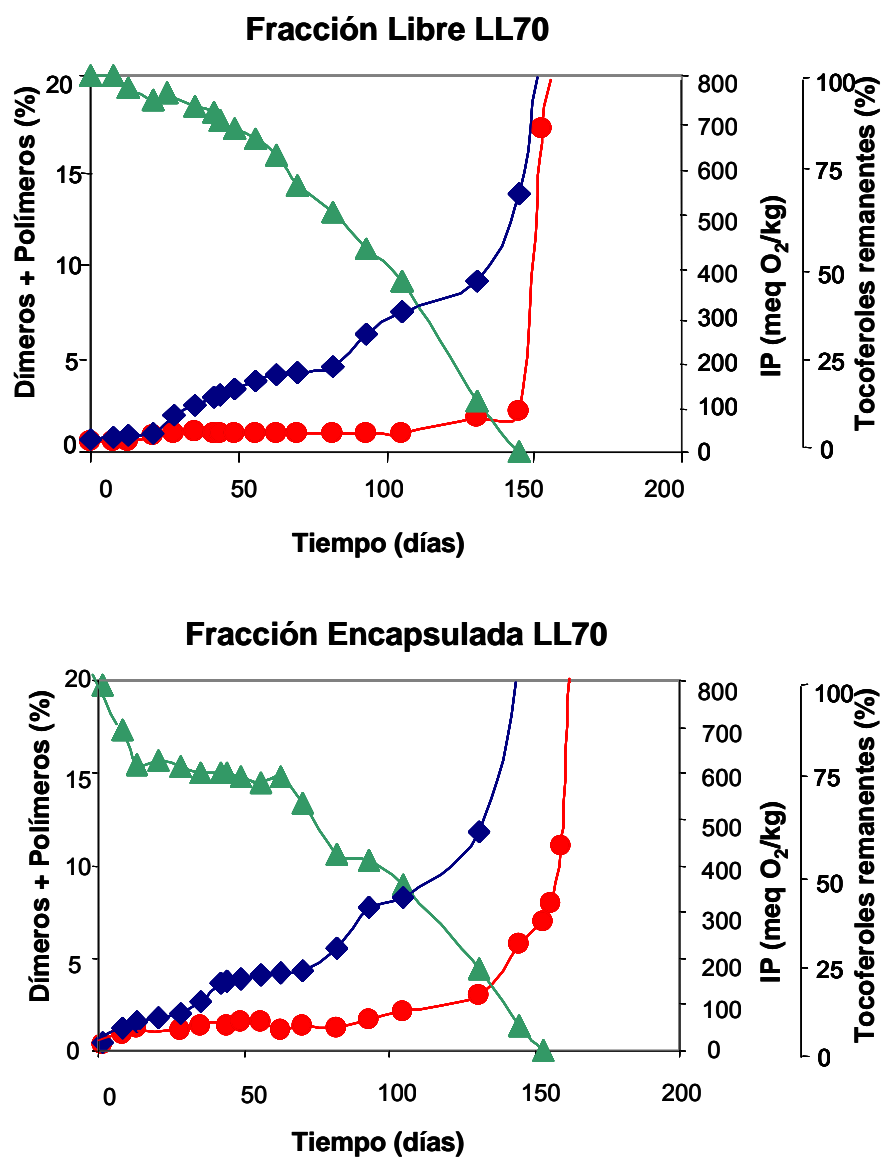


Figura 4.15- Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de la muestra LL70 sometida a 30 °C, HR de 0% y oscuridad. Índice de peróxidos (IP) (◆), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

La **Figura 4.15** muestra la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de la muestra con matriz láctea elaborada mediante liofilización (LL70). Como en estudios previos (Velasco *et al.*, 2006; 2009a) y de forma similar a lo encontrado para la muestra atomizada, el comportamiento oxidativo de la fracción de aceite libre fue el característico de un aceite en fase continua, y la fracción encapsulada presentó oxidación discontinua. En este sentido, en la fracción libre la formación sustancial de los compuestos de polimerización tuvo lugar tras la pérdida total de antioxidantes (145 días), cuando el índice de peróxidos alcanzó un valor elevado (548 meq/kg). Por el contrario, en la fracción encapsulada la polimerización tuvo lugar en presencia de cantidades relativamente elevadas de tocoferoles. Las diferencias encontradas en la relación entre tocoferoles remanentes y las cantidades de dímeros y polímeros entre las fracciones de aceite libre y encapsulado fueron también similares a las observadas en la muestra LA70. En cuanto a la EE, no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento.

A diferencia de lo encontrado en la muestra atomizada, la oxidación global de la fracción encapsulada de la muestra LL70 fue sorprendentemente más rápida que la de la fracción de aceite libre. En este sentido, el índice de peróxidos aumentó a una velocidad ligeramente superior desde los primeros estadios del desarrollo oxidativo. En estudios previos se ha establecido que las diferencias en la velocidad de oxidación global entre las fracciones de aceite libre y encapsulado dependen de numerosos factores, entre los que se encuentra la velocidad de difusión de oxígeno a través de la matriz. Si la reacción de oxidación es más lenta que la difusión de oxígeno, la segunda deja de ser la etapa determinante de la velocidad del desarrollo oxidativo (Velasco *et al.*, 2009b).

Con fines comparativos, en la **Figura 4.16** se ha representado el aumento del índice de peróxidos, el contenido de polímeros y la pérdida de tocoferoles, hallados en las muestras liofilizada y atomizada.

Como se deduce del contenido de polímeros y de la pérdida total de antioxidantes, la fracción de aceite libre alcanzó el final del periodo de inducción antes en la muestra atomizada (117 días) que en la liofilizada (145 días). Por tanto, se podría decir que la oxidación de la fracción de aceite libre fue más rápida en la primera. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, cuando se alcanza el final del periodo de inducción el nivel de oxidación es muy elevado desde el punto de vista de la percepción sensorial. Desde un punto de vista práctico, sería mucho más conveniente examinar el desarrollo oxidativo durante las primeras etapas del proceso, y no al final del periodo de inducción. Si consideramos que en alimentos sometidos a baja temperatura no es de esperar encontrar niveles de oxidación superiores a un 5 % en peso sobre materia grasa, porque la rancidez es fácilmente detectable (Márquez-Ruiz *et al.*, 1996b; Velasco *et al.*, 2010), podríamos

establecer como límite superior un valor del índice de peróxidos de 100 meq/kg, que corresponde a un 4,5 % en peso de triglicéridos oxidados (considerando un peso molecular de 900). En este sentido, la fracción de aceite libre alcanzó un valor de IP de 100 meq/kg entre los 44 y 49 días en la muestra atomizada y a los 35 días en la liofilizada. Por tanto, mientras el final del periodo de inducción fue alcanzado antes en la muestra atomizada, la oxidación en las primeras etapas del proceso fue más rápida en la liofilizada. Estos resultados podrían estar relacionados con un mayor contenido de humedad en la muestra atomizada durante los primeros días de almacenamiento, como se deduce de los valores de a_w hallados en las muestras iniciales (**Tabla 4.11**). En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado el papel protector de la humedad relativa sobre la fracción de aceite libre (Velasco *et al.*, 2009b).

Por otra parte, las tres determinaciones empleadas para evaluar la oxidación muestran claramente una mayor protección de la fracción encapsulada en la muestra atomizada que en la liofilizada a lo largo de todo el proceso estudiado (**Figura 4.16**). Por tanto, se puede concluir que durante las primeras etapas del desarrollo oxidativo la oxidación fue más rápida en la muestra liofilizada, no sólo en la fracción encapsulada, sino también en la fracción de aceite libre.

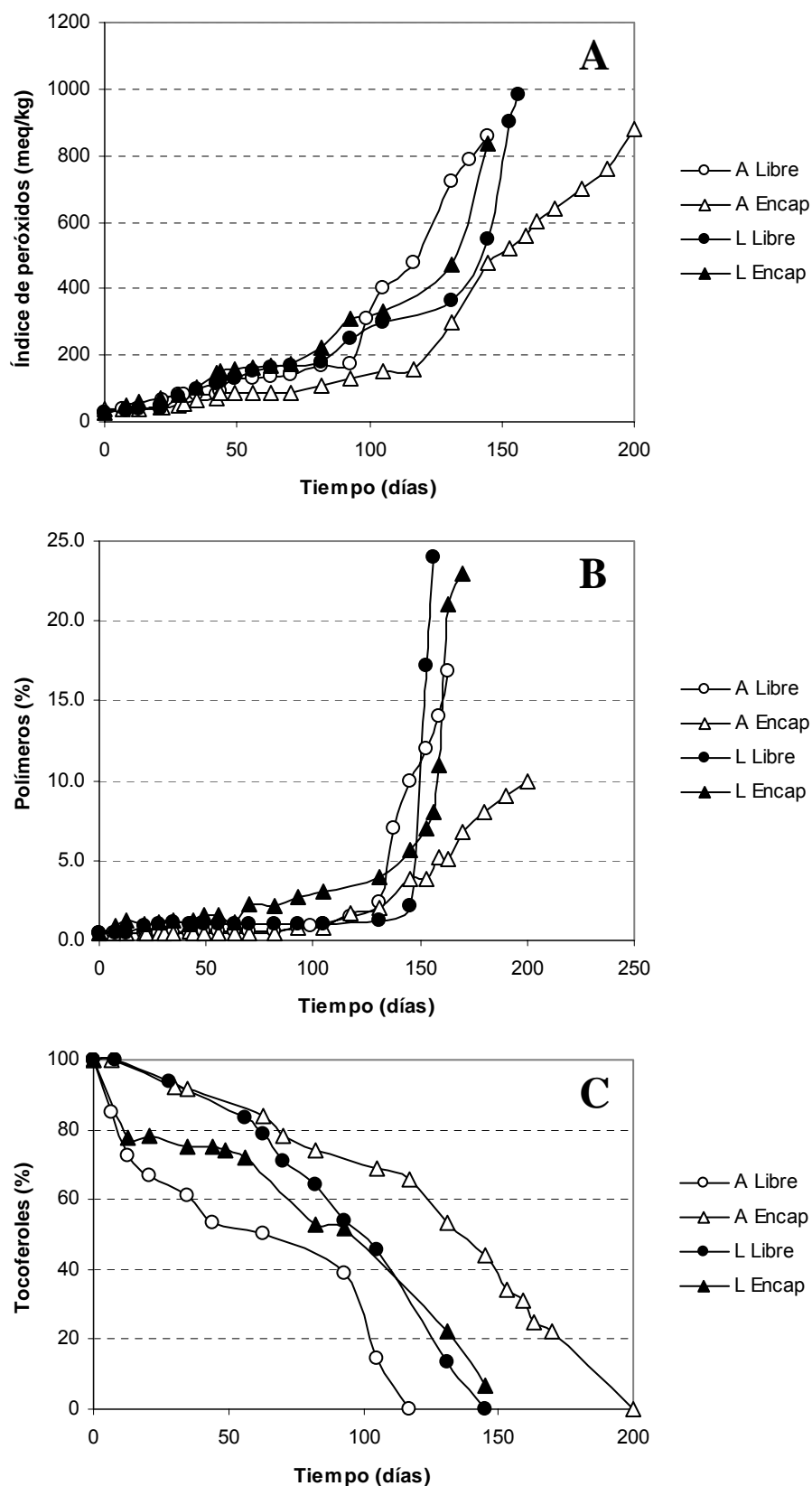


Figura 4.16 - Influencia del método de secado sobre el comportamiento oxidativo de la muestra de matriz láctea.

4.2.1.3.- Comportamiento oxidativo del aceite de girasol encapsulado: muestras con matriz de maltodextrina

La **Figura 4.17** muestra la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de las muestras elaboradas con matriz de maltodextrina, 70 MPa de presión y secadas por atomización (MA70) o liofilización (ML70).

La evolución de la oxidación en ambas muestras fue similar a las anteriormente descritas para las muestras lácteas. Así, la fracción de aceite libre presentó un comportamiento similar al de un aceite en fase continua, caracterizado por el inicio de polimerización sustancial tras la pérdida total de tocoferoles; y la fracción encapsulada mostró oxidación discontinua, encontrándose cantidades relativamente elevadas de compuestos de polimerización en muestras que aún contenían cantidades importantes de tocoferoles.

Como se puede observar, en ambas muestras, atomizada y liofilizada, la oxidación transcurrió más rápidamente en la fracción de aceite libre, poniéndose claramente de manifiesto el papel protector de la matriz de maltodextrina durante el almacenamiento.

Los resultados del aumento del índice de peróxidos y del contenido de polímeros, así como también de la pérdida de tocoferoles, muestran que el método de secado no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad oxidativa de las fracciones de aceite libre y encapsulado, a diferencia de lo observado para las muestras lácteas. Así, el final del periodo de inducción de la fracción de aceite libre fue detectado prácticamente al mismo tiempo para las dos muestras, 87 días para la muestra atomizada y 79 días para la liofilizada. No obstante, la muestra atomizada alcanzó un valor de IP de 100 meq/kg antes de los 7 días de almacenamiento, mientras que en la muestra liofilizada tuvo lugar posteriormente, aproximadamente a los 21 días.

La fracción encapsulada mostró una evolución paralela de las tres medidas, con excepción de la pérdida de tocoferoles durante las primeras etapas de oxidación, que fue más rápida para la muestra liofilizada (**Figura 4.17 C**). No obstante, la pérdida total de tocoferoles en esta fracción tuvo lugar prácticamente al mismo tiempo (127-130 días) en ambas muestras.

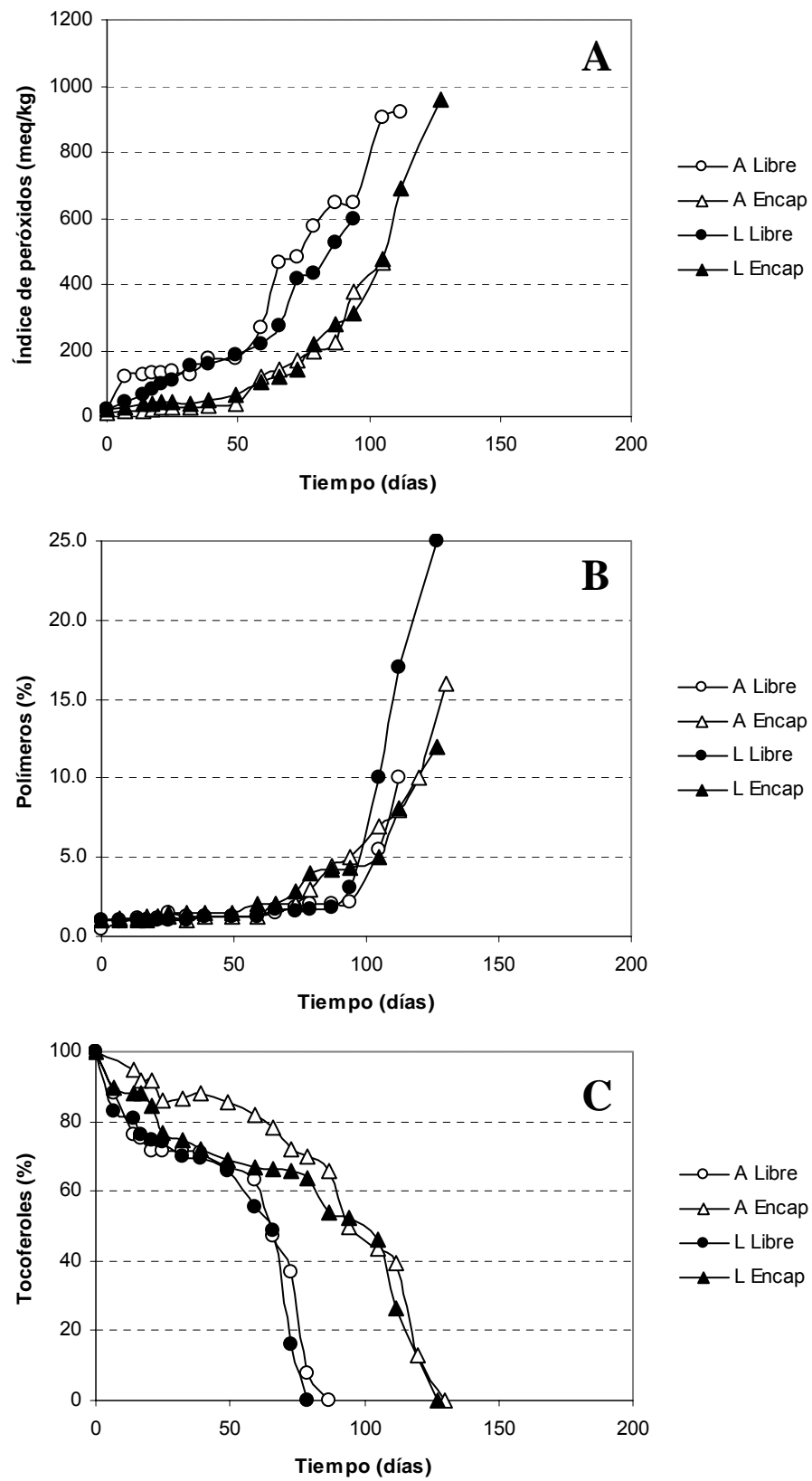


Figura 4.17 - Influencia del método de secado sobre el comportamiento oxidativo de la muestra de matriz de maltodextrina.

Por otro lado, a diferencia de lo encontrado en las muestras de matriz láctea, se observaron cambios en la EE durante el almacenamiento. La EE aumentó significativamente a partir de aproximadamente 100 días (**Figura 4.18**), lo que puede ser atribuido a cambios estructurales de la matriz de encapsulación. Este fenómeno puede estar justificado por los valores de Tg más bajos (38 - 41 °C) de las muestras de maltodextrina, que fueron más próximos a la temperatura de almacenamiento (30 °C). El aumento de EE ha sido definido como fenómeno de “re-encapsulación”. Los cambios estructurales de la matriz a tiempos prolongados de almacenamiento dificultan la extracción de la fracción de aceite libre, como consecuencia del colapso y de la consiguiente reducción de la porosidad (Ponginebbi *et al*, 2000, Hardas *et al.*, 2002).

En relación con las muestras de matriz láctea, las muestras de maltodextrina también fueron menos estables desde el punto de vista oxidativo. El final del periodo de inducción en la fracción de aceite libre (79 - 87 días) tuvo lugar mucho antes que en las muestras lácteas (117 días para la muestra atomizada y 145 días para la muestra liofilizada). Asimismo, el IP alcanzó un valor de 100 meq/kg mucho antes en las muestras de matriz de maltodextrina, antes de los 7 días en la muestra atomizada y a los 21 días en la muestra liofilizada, frente a los 44 - 49 días y a los 35 días, respectivamente, en las correspondientes muestras lácteas. Estos resultados están de acuerdo con una mayor oxidación incipiente encontrada en las muestras iniciales de matriz de maltodextrina (**Tabla 4.14**). Con respecto a la fracción encapsulada, la pérdida total de tocoferoles tuvo lugar antes (127 - 130 días) que en las muestras lácteas (aproximadamente a los 150 días para la liofilizada y a los 200 días para la atomizada). En general, estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Drusch y colaboradores (2007), que observaron que la adición de caseinatos en la formulación de aceites microencapsulados tuvo una influencia positiva para retardar el desarrollo oxidativo en muestras obtenidas por atomización.

Es interesante remarcar que no se haya encontrado una influencia significativa del método de secado en el comportamiento oxidativo de las muestras de maltodextrina, en claro contraste con lo observado en las muestras lácteas. Así mismo, entre los principales parámetros fisicoquímicos analizados, no se encontraron diferencias significativas en la EE entre las muestras ML70 y MA70, y los valores del tamaño promedio y dispersión de tamaños de glóbulos de aceite fueron en ambos casos muy elevados, como consecuencia de una menor estabilidad de la emulsión. Sin embargo, en el resto de parámetros fisicoquímicos evaluados se observó la misma tendencia que la encontrada en las muestras lácteas cuando se comparó la muestra liofilizada con la atomizada. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio indican que el efecto del método de secado depende en gran medida de la matriz utilizada.

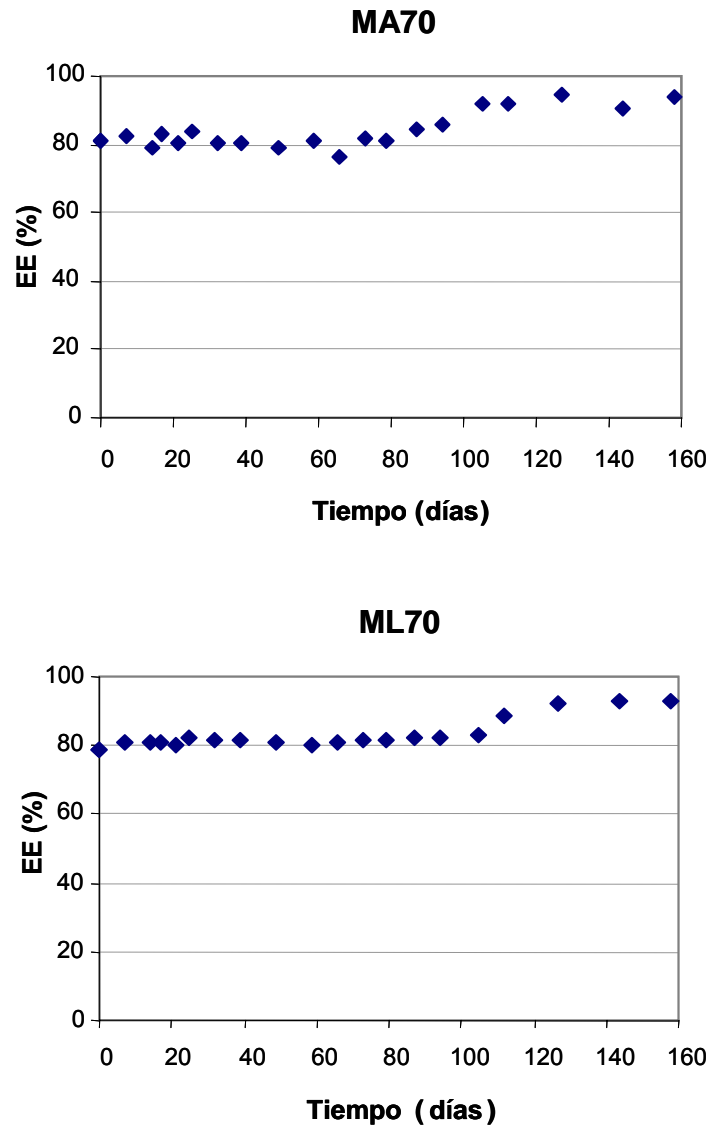


Figura 4.18 - Evolución de la eficacia de encapsulación (EE) de las muestras MA70 y ML70 durante el almacenamiento a 30 °C, 0 % HR y oscuridad.

Por otra parte, no se puede descartar la acción de impurezas metálicas, con carácter prooxidante, que siempre están presentes en los diferentes productos utilizados para la elaboración de aceites microencapsulados. En este sentido, la mayor oxidación de la fracción de aceite libre en las muestras iniciales de la matriz de maltodextrina, como indican los valores del IP, podría estar relacionada con una mayor actividad de impurezas metálicas, con un papel determinante desde la etapa de elaboración de los microencapsulados.

Hasta ahora, sólo tres grupos de investigadores han estudiado la influencia del método de secado partiendo de las mismas emulsiones, con resultados incompletos y difíciles de interpretar por la deficiencia analítica de los métodos utilizados. Sims y colaboradores prepararon emulsiones constituidas mayoritariamente por aceite de cártamo y distintos azúcares o jarabe de maíz, y encontraron que la oxidación fue más rápida en muestras liofilizadas frente a atomizadas, atribuyendo los resultados a un mayor valor del área superficial de las primeras (Fioriti *et al.*, 1975; Sims, 1994). Similares conclusiones fueron extraídas por Taguchi, utilizando microencapsulados de aceite de sardina con matriz formada por clara de huevo (Taguchi *et al.*, 1992). No obstante, la información analítica en estos trabajos es deficiente y ni siquiera se caracteriza inicialmente la EE. En comparación con un método de secado por aire a 50 °C durante 30 minutos, en un mecanismo donde el aire caliente actúa sobre gotas de emulsión pendidas de filamentos de vidrio ("hot-drying"), el grupo de Minemoto encontró menor oxidación en muestras liofilizadas de linoleato de metilo con matriz formada por goma arábica (Minemoto *et al.*, 1997). Se determinó la EE en las muestras iniciales (aproximadamente 90 % para la muestra liofilizada y 99 % para sus análogos "hot-dried") y a lo largo del periodo de almacenamiento, pero la oxidación se evaluó en la grasa total. En un trabajo reciente se ha encontrado que la leche entera reconstituida a partir de leche en polvo obtenida por liofilización se encontraba menos oxidada que la reconstituida a partir de leche en polvo obtenida por atomización (Kim *et al.*, 2010).

Tabla 4.15- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (70 MPa) atomizada.

| Láctea Atomizada LA70 | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 6,9 | 665 | 0,4 | 0 | 4,0 | 682 | 0,5 |
| 7 | 36 | 579 | 0,4 | 7 | 27 | 678 | 0,5 |
| 13 | 40 | 492 | 0,5 | 13 | 40 | 658 | 0,5 |
| 21 | 48 | 454 | 0,4 | 21 | 41 | 635 | 0,5 |
| 22 | 64 | 453 | 0,5 | 22 | 44 | 624 | 0,5 |
| 28 | 80 | 431 | 0,4 | 28 | 48 | 624 | 0,5 |
| 30 | 80 | 408 | 0,5 | 30 | 52 | 627 | 0,5 |
| 35 | 84 | 414 | 0,5 | 35 | 64 | 622 | 0,5 |
| 42 | 84 | 386 | 0,5 | 42 | 72 | 578 | 0,6 |
| 44 | 92 | 364 | 0,6 | 44 | 88 | 590 | 0,5 |
| 49 | 128 | 340 | 0,6 | 49 | 87 | 585 | 0,5 |
| 56 | 132 | 340 | 0,6 | 56 | 88 | 578 | 0,5 |
| 63 | 136 | 341 | 0,6 | 63 | 86 | 570 | 0,5 |
| 70 | 140 | 329 | 0,6 | 70 | 89 | 531 | 0,5 |
| 82 | 168 | 318 | 0,6 | 82 | 108 | 503 | 0,5 |
| 93 | 176 | 265 | 0,8 | 93 | 132 | 488 | 0,8 |
| 99 | 308 | 260 | 0,9 | | | | |
| 105 | 400 | 100 | 1,0 | 105 | 152 | 470 | 0,8 |
| 117 | 480 | 0 | 1,5 | 117 | 160 | 446 | 1,7 |
| 131 | 720 | | 2,4 | 131 | 299 | 363 | 2,0 |
| 138 | 788 | | 7,0 | | | | |
| 145 | 856 | | 10,0 | 145 | 480 | 299 | 3,8 |
| 153 | 1276 | | 12,0 | 153 | 521 | 234 | 3,9 |
| 159 | | | 14,0 | 159 | 560 | 213 | 5,2 |
| 163 | | | 16,8 | 163 | 602 | 169 | 5,1 |
| 170 | 1288 | | 27,1 | 170 | 641 | 150 | 6,8 |
| | | | | 180 | 698 | 68 | 8,0 |
| | | | | 190 | 762 | 34 | 9,0 |
| | | | | 200 | 879 | 0 | 10,0 |

Tabla 4.16- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (70 MPa) liofilizada.

| Láctea Liofilizada LL70 | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 4,8 | 784 | 0,5 | 0 | 5,2 | 735 | 0,5 |
| 8 | 32 | 780 | 0,5 | 8 | 48 | 637 | 0,9 |
| 13 | 36 | 758 | 0,5 | 13 | 60 | 570 | 1,2 |
| 21 | 40 | 732 | 0,9 | 21 | 72 | 576 | 1,0 |
| 28 | 76 | 737 | 1,0 | 28 | 80 | 564 | 1,1 |
| 35 | 100 | 722 | 1,1 | 35 | 104 | 552 | 1,3 |
| 42 | 116 | 706 | 1,0 | 42 | 148 | 550 | 1,0 |
| 44 | 120 | 693 | 1,0 | 44 | 152 | 549 | 1,3 |
| 49 | 132 | 675 | 1,0 | 49 | 156 | 544 | 1,6 |
| 56 | 152 | 653 | 1,0 | 56 | 164 | 531 | 1,6 |
| 63 | 164 | 617 | 1,0 | 63 | 168 | 544 | 1,1 |
| 70 | 168 | 555 | 1,0 | 70 | 172 | 490 | 2,3 |
| 82 | 180 | 502 | 1,0 | 82 | 220 | 388 | 2,2 |
| 93 | 252 | 424 | 1,0 | 93 | 308 | 379 | 2,7 |
| 105 | 300 | 358 | 1,0 | 105 | 332 | 331 | 3,1 |
| 131 | 364 | 104 | 1,2 | 131 | 472 | 164 | 4,0 |
| 145 | 548 | 0 | 2,2 | 145 | 836 | 49 | 5,7 |
| 153 | 904 | | 17,2 | 153 | 1400 | 0 | 7,0 |
| 156 | 984 | | 24,0 | 156 | 2072 | | 8,0 |
| 159 | 1184 | | 25,0 | 159 | 2112 | | 11,0 |
| 163 | | | 31,0 | 163 | | | 21,0 |
| 170 | | | | 170 | | | 23,0 |
| | | | | 190 | | | 31,0 |

Tabla 4.17- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (70 MPa) atomizada.

| Maltodextrina Atomizada MA70 | | | | | | | |
|------------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 10,7 | 675 | 0,5 | 0 | 3,5 | 762 | 1,0 |
| 7 | 123 | 595 | 0,9 | 7 | 14,4 | | 1,1 |
| 14 | 126 | 515 | 1,1 | 14 | 16,0 | 722 | 1,1 |
| 17 | 130 | 506 | 1,0 | 17 | 23,2 | 700 | 1,2 |
| 21 | 132 | 484 | 1,1 | 21 | 24,8 | 698 | 1,3 |
| 25 | 138 | 483 | 1,5 | 25 | 24,8 | 654 | 1,2 |
| 32 | 126 | 481 | 1,2 | 32 | 24,8 | 660 | 1,0 |
| 39 | 174 | 480 | 1,2 | 39 | 35,2 | 670 | 1,2 |
| 49 | 175 | 452 | 1,2 | 49 | 39,2 | 650 | 1,3 |
| 59 | 266 | 426 | 1,3 | 59 | 119 | 625 | 1,3 |
| 66 | 468 | 317 | 1,5 | 66 | 140 | 595 | 2,0 |
| 73 | 480 | 248 | 1,8 | 73 | 171 | 550 | 2,0 |
| 79 | 573 | 53 | 2,0 | 79 | 200 | 534 | 3,0 |
| 87 | 644 | 0 | 2,1 | 87 | 224 | 500 | 4,5 |
| 94 | 646 | | 2,2 | 94 | 376 | 380 | 5,0 |
| 105 | 903 | | 5,5 | 105 | 468 | 330 | 7,0 |
| 112 | 920 | | 10,0 | 112 | 900 | 302 | 8,0 |
| | | | | 120 | | 98 | 10,0 |
| | | | | 130 | | 0 | 16,0 |

Tabla 4.18- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (70 MPa) liofilizada.

| Maltodextrina Liofilizada ML70 | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 13,7 | 630 | 1,0 | 0 | 5,2 | 721 | 1,0 |
| 7 | 44 | 522 | 1,0 | 7 | 26 | 647 | 1,0 |
| 14 | 68 | 509 | 1,0 | 14 | 37 | 637 | 1,0 |
| 17 | 80 | 480 | 1,0 | 17 | 39 | 636 | 1,0 |
| 21 | 98 | 472 | 1,0 | 21 | 43 | 608 | 1,3 |
| 25 | 112 | 469 | 1,0 | 25 | 44 | 553 | 1,5 |
| 32 | 152 | 440 | 1,0 | 32 | 39 | 539 | 1,5 |
| 39 | 161 | 439 | 1,2 | 39 | 48 | 520 | 1,5 |
| 49 | 188 | 414 | 1,2 | 49 | 64 | 497 | 1,5 |
| 59 | 220 | 350 | 1,3 | 59 | 102 | 483 | 2,0 |
| 66 | 272 | 306 | 1,7 | 66 | 118 | 479 | 2,1 |
| 73 | 419 | 100 | 1,6 | 73 | 144 | 473 | 2,9 |
| 79 | 432 | 0 | 1,7 | 79 | 220 | 460 | 4,0 |
| 87 | 528 | | 1,8 | 87 | 281 | 388 | 4,2 |
| 94 | 599 | | 3,1 | 94 | 312 | 378 | 4,3 |
| 105 | 1236 | | 10,0 | 105 | 478 | 331 | 5,0 |
| 112 | 2268 | | 17,0 | 112 | 692 | 189 | 8,1 |
| 127 | | | 25,0 | 127 | 960 | 0 | 12,0 |

4.2.2.- Influencia de la presión de homogeneización en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos en los ensayos de almacenamiento realizados con muestras de distinta matriz (láctea o maltodextrina) elaboradas a una presión de homogeneización más baja, 15 MPa, y mediante liofilización como método de secado, LL15 y ML15 (**Tabla 4.19**), y se comparan con los resultados obtenidos para las mismas muestras elaboradas a 70 MPa (apartado 4.2.1).

Evaluación del estado de oxidación en las muestras iniciales

La **Tabla 4.19** recoge todos los parámetros analíticos indicadores del estado de oxidación de los aceites microencapsulados iniciales, así como del aceite de girasol utilizado. Las muestras se evaluaron mediante los mismos métodos utilizados para las muestras del apartado 4.2.1. (**Tabla 4.14**). Igualmente, los resultados obtenidos aquí demuestran que los procesos utilizados en la elaboración de las muestras no dieron lugar a la formación de cantidades sustanciales de compuestos de oxidación. Sólo se observaron ligeros aumentos en el IP, que fueron más bajos para la fracción de aceite encapsulado, lo que denota el papel protector de la matriz de encapsulación durante el proceso de secado. Así mismo, con respecto al aceite inicial, se observó una pérdida significativa de tocoferoles en todos los extractos, siendo más elevada en la muestra de maltodextrina (23 – 25 %) frente a la muestra láctea (12 – 16 %). Estos resultados son similares a los obtenidos en las muestras preparadas con una presión de homogeneización de 70 MPa (**Tabla 4.14**).

Los valores de estabilidad oxidativa (**Tabla 4.19** y **Figura 4.19**) fueron similares para las dos muestras, LL15 y ML15. Así mismo, las muestras de matriz láctea preparadas con diferentes presiones de homogeneización, LL15 y LL70, las cuales presentaron bajos valores de EE, mostraron valores de estabilidad oxidativa similares. Con respecto a las muestras de maltodextrina, la estabilidad oxidativa de ML15 (5,0 h), con EE de 65,7 %, fue significativamente inferior a la de ML70 (8,1 h), con EE de 77,1 %. En general, los valores de estabilidad oxidativa más altos (8,1 - 8,6 h) correspondieron a las muestras con menor cantidad de aceite libre (LA70, MA70 y LM70), mientras que los más bajos (5,0 - 5,9 h) correspondieron a las muestras con mayor cantidad (ML15, LL70 y LL15). No obstante, como se ha comentado en el apartado anterior, los resultados de estabilidad no pueden ser atribuidos directamente a las diferencias de EE o, más concretamente, a la cantidad de aceite libre, ya que no se pueden descartar cambios estructurales de la matriz de encapsulación durante la medida.

Tabla 4.19 - Parámetros indicadores de cambios oxidativos e hidrolíticos en el aceite inicial y en los aceites microencapsulados.

| Muestra | C.P. (% en aceite) | Distribución de C.P. (% en aceite) | | | | IP (meq O ₂ /kg aceite) | Tocoferoles (mg/kg) | Estabilidad Oxidativa (h)* |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| | | Pol+Dim | TGMox | DG | AG | | | |
| Aceite Inicial | 4,9 | 0,7 ± 0,05 ^{ab} | 2,4 ± 0,09 ^a | 1,4 ± 0,08 ^a | 0,4 ± 0,01 ^a | 3,0 ± 0,12 ^a | 891 ± 12 ^c | 10,7 ± 0,07 ^b |
| LL15 LIB | 5,6 | 0,7 ± 0,07 ^{ab} | 2,9 ± 0,18 ^{bc} | 1,5 ± 0,09 ^a | 0,5 ± 0,03 ^{ab} | 8,1 ± 0,40 ^c | 780 ± 22 ^b | 5,1 ± 0,08 ^a |
| LL15 ENC | 5,4 | 0,6 ± 0,08 ^a | 2,5 ± 0,10 ^a | 1,5 ± 0,10 ^a | 0,8 ± 0,02 ^c | 5,5 ± 0,27 ^b | 745 ± 20 ^b | |
| ML15 LIB | 5,9 | 0,8 ± 0,09 ^b | 3,2 ± 0,15 ^c | 1,4 ± 0,08 ^a | 0,5 ± 0,08 ^{ab} | 10,6 ± 0,55 ^d | 668 ± 15 ^a | 5,0 ± 0,06 ^a |
| ML15 ENC | 5,5 | 0,7 ± 0,05 ^{ab} | 2,6 ± 0,12 ^{ab} | 1,6 ± 0,09 ^a | 0,6 ± 0,04 ^b | 5,8 ± 0,72 ^b | 686 ± 20 ^a | |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de la media de 3 muestras.

LIB: fracción de aceite libre; ENC: fracción de aceite encapsulado; C.P.: Compuestos polares totales; Pol+Dim: Polímeros y dímeros de triglicéridos; TGMox: Triglicéridos monómeros oxidados; DG: Diglicéridos; AG: Ácidos grasos libres; IP: índice de peróxidos.

* La estabilidad oxidativa fue medida directamente en las muestras de polvo.

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05).

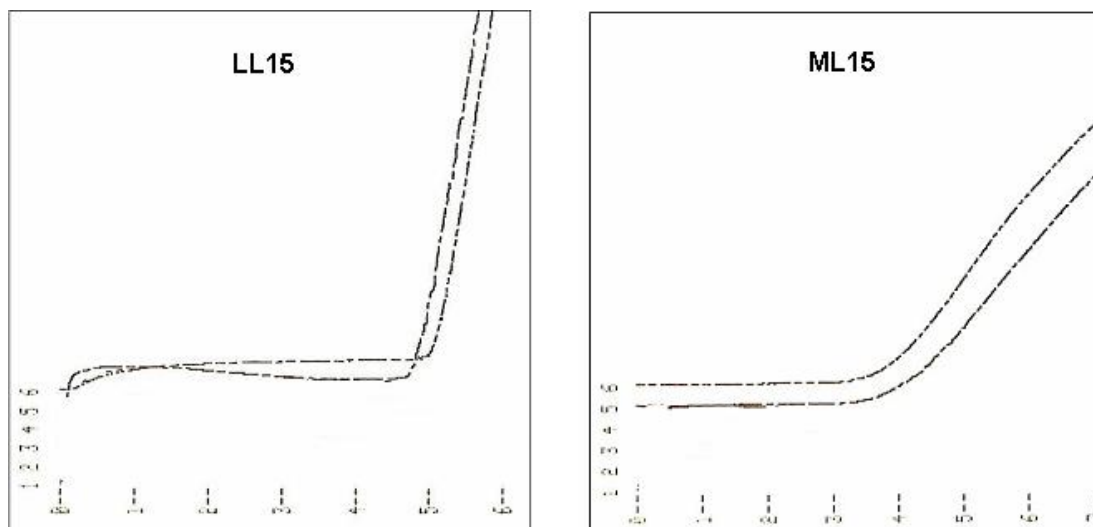


Figura 4.19 - Registros de la medida de estabilidad oxidativa en Rancimat (aumento de la conductividad, $\mu\text{S cm}^{-1}$, frente al tiempo, h) correspondiente a aceites microencapsulados preparados a 15 MPa y secados mediante liofilización con matriz láctea (LL15) y con matriz de maltodextrina (ML15).

Evaluación de la oxidación en ensayos de almacenamiento

Para la evaluación de la oxidación de los aceites microencapsulados LL15 y ML15 se han aplicado las mismas determinaciones analíticas utilizadas en los apartados anteriores: el índice de peróxidos, la cuantificación de dímeros y polímeros de triglicéridos, y la pérdida de tocoferoles. Los resultados obtenidos para las muestras estudiadas han sido recogidos en tablas al final del apartado 4.2.2. (**Tablas 4.20 y 4.21**).

4.2.2.1.- Muestras con matriz láctea

La **Figura 4.20** muestra la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de las muestras elaboradas con matriz láctea, 15 MPa de presión y secadas por liofilización (LL15). Con fines comparativos también se han incluido los resultados de las muestras elaboradas a 70 MPa (LL70).

Los comportamientos oxidativos de las fracciones libre y encapsulada de LL15 fueron similares a los mostrados por todas las muestras descritas anteriormente, es decir, la fracción libre presentó un comportamiento típico de aceites en fase continua, mientras que la fracción encapsulada mostró oxidación discontinua. En la fracción de aceite libre se observó un claro periodo de inducción (121 días), cuyo final estuvo marcado por la pérdida total de tocoferoles, un aumento rápido de los compuestos de polimerización y un elevado

valor del índice de peróxidos (560 meq O₂/kg). Por otro lado, la fracción encapsulada se caracterizó por la coexistencia de cantidades relativamente elevadas de compuestos de polimerización en muestras con altos contenidos de tocoferoles.

Como se observó en la muestra LL70, las velocidades de oxidación global de las fracciones libre y encapsulada fueron similares durante las primeras etapas del desarrollo oxidativo. La evolución del IP fue similar para ambas fracciones, si bien los valores fueron ligeramente más altos en la fracción de aceite libre. Como resultado, en la fracción de aceite libre se alcanzó un valor de IP = 100 meq/kg relativamente antes, entre 7 y 14 días de almacenamiento, que en la fracción encapsulada, entre 14 y 21 días. A partir de 21 días de almacenamiento se observó sorprendentemente que el aumento del IP fue ligeramente más rápido en la fracción encapsulada, alcanzando un valor máximo de 904 meq/kg a los 93 días, frente a 304 meq/kg en la fracción de aceite libre.

Los valores del contenido de polímeros mostraron una mayor polimerización de la fracción encapsulada a lo largo de todo el periodo de almacenamiento.

El contenido de tocoferoles evolucionó paralelamente en las dos fracciones de aceite, aunque pérdidas ligeramente más rápidas fueron registradas en la fracción de aceite libre. Sin embargo, la pérdida total de tocoferoles fue detectada al mismo tiempo (121 días) en ambas fracciones.

Por otra parte, el aumento del IP y del contenido de polímeros, así como la pérdida de tocoferoles, mostraron claramente que la oxidación en la muestra LL15 fue más rápida que en la LL70, tanto en la fracción de aceite libre como en la fracción encapsulada.

En cuanto a la evolución de la EE, al igual que lo encontrado para las demás muestras lácteas (LA70 y LL70), no se hallaron diferencias significativas a lo largo del periodo de almacenamiento.

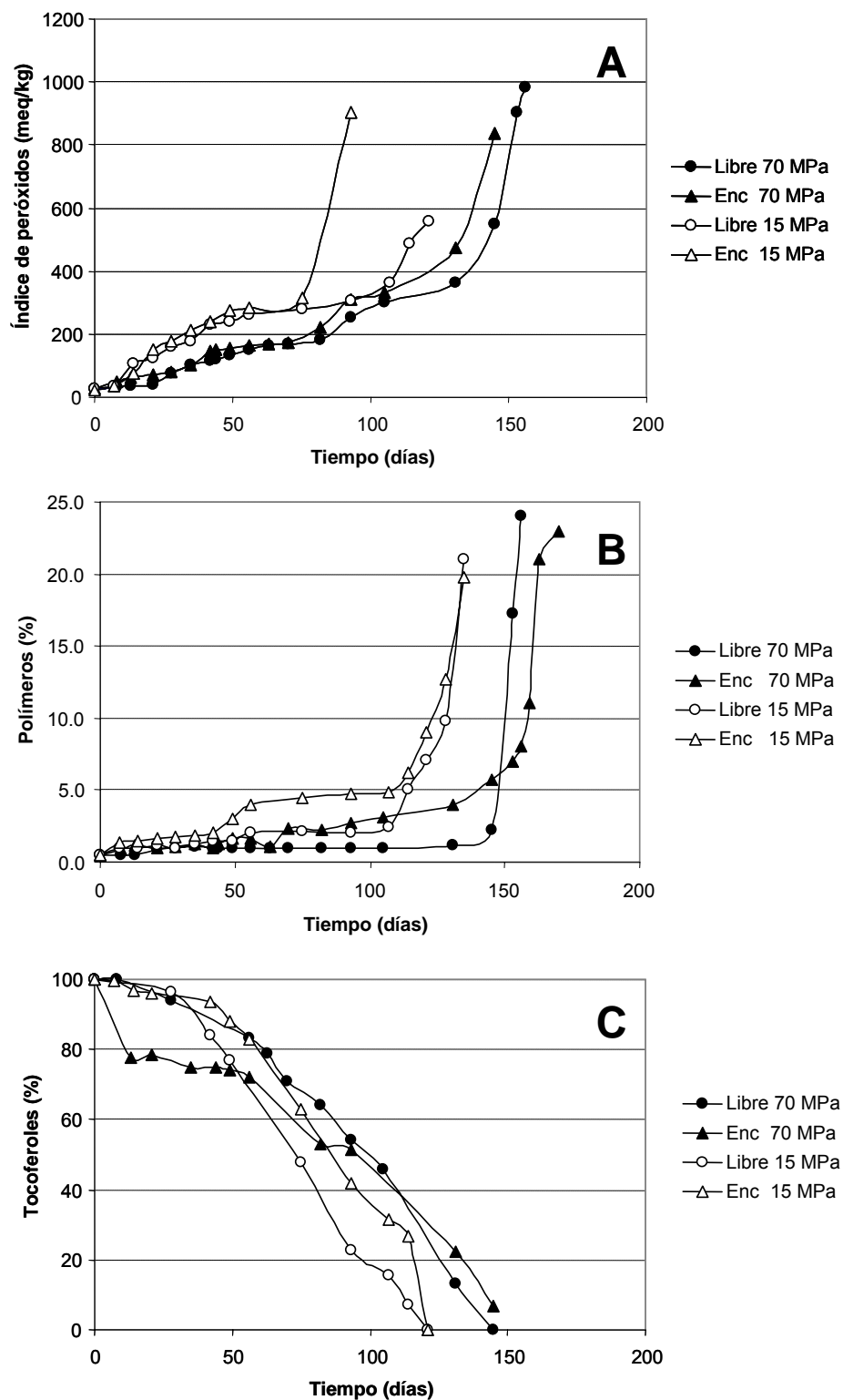


Figura 4.20 – Influencia de la presión de homogeneización sobre el comportamiento oxidativo de la muestra con matriz láctea.

4.2.2.2.- Muestras con matriz de maltodextrina

La **Figura 4.21** muestra la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de las muestras elaboradas con matriz de maltodextrina, 15 MPa de presión y secadas por liofilización (ML15). Con fines comparativos también se han incluido los resultados de las muestras elaboradas a 70 MPa.

Al igual que todas las muestras de microencapsulados estudiadas en apartados anteriores, la fracción de aceite libre de la muestra ML15 mostró oxidación continua, es decir, un comportamiento típico de aceites en fase continua, mientras que la fracción encapsulada presentó oxidación discontinua.

De forma similar a lo encontrado en la muestra láctea, las velocidades de oxidación global de las fracciones libre y encapsulada de la muestra ML15 fueron similares durante las primeras etapas del desarrollo oxidativo. El aumento del IP fue similar para ambas fracciones, si bien los valores fueron ligeramente más altos en la fracción de aceite libre. Ambas fracciones alcanzaron un valor del IP de 100 meq/kg entre 7 y 14 días de almacenamiento. Sin embargo, y de forma similar a lo encontrado en la muestra LL15, a partir de los 21 días de almacenamiento el aumento del IP fue sorprendentemente más rápido en la fracción encapsulada.

Los valores del contenido de polímeros mostraron una mayor polimerización de la fracción encapsulada a lo largo de todo el periodo estudiado.

La pérdida de tocoferoles fue más rápida en la fracción de aceite libre a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. La pérdida total tuvo lugar a los 114 días en la fracción de aceite libre, mientras que la fracción encapsulada presentó cantidades relativamente elevadas de tocoferol al final del ensayo.

Por otro lado, al igual que en las muestras de matriz de maltodextrina estudiadas en el apartado anterior, se observaron cambios en la EE. Ésta aumentó significativamente a partir de aproximadamente 100 días (**Figura 4.22**), indicando cambios estructurales de la matriz de encapsulación.

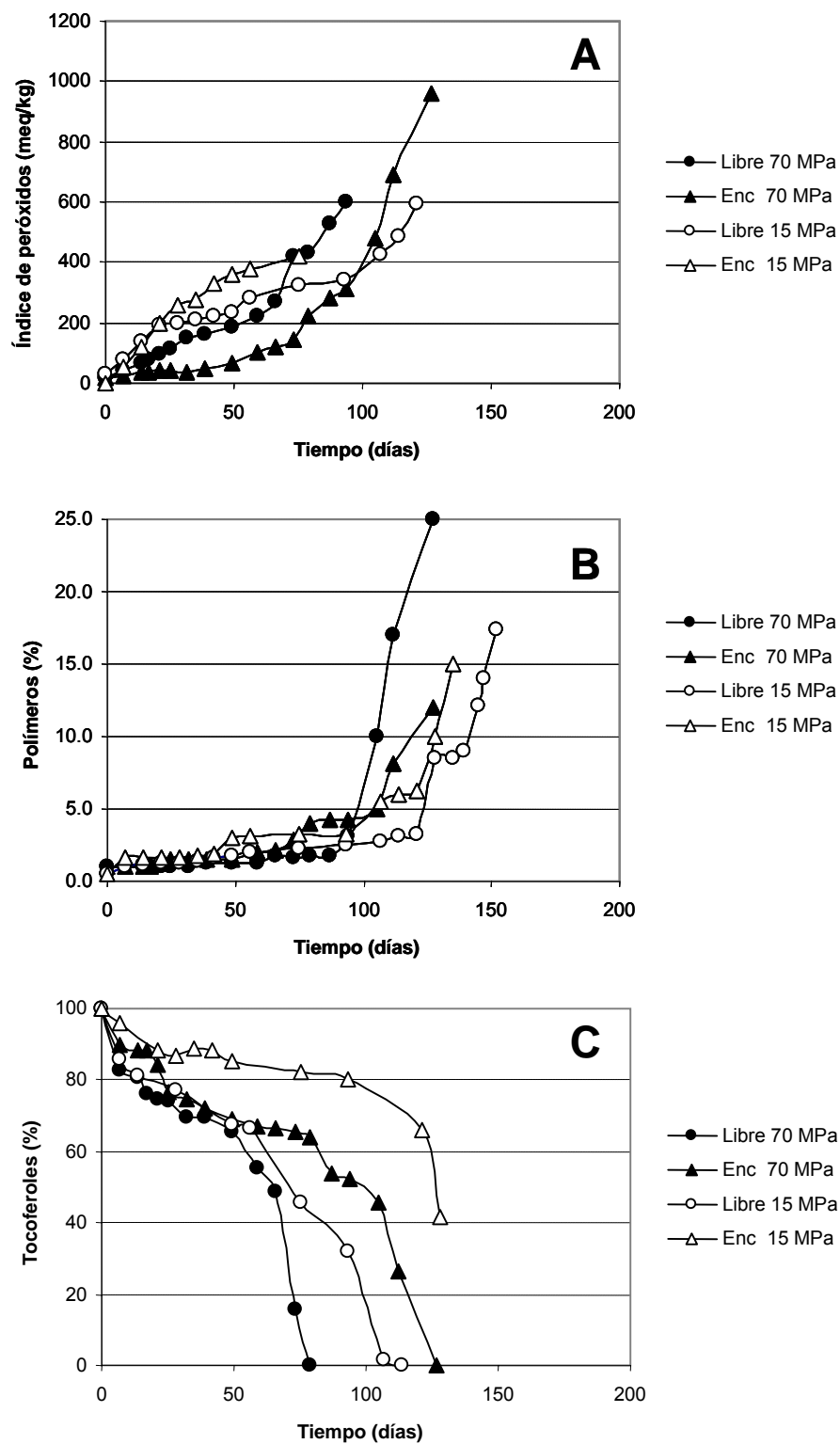


Figura 4. 21 – Influencia la presión de homogeneización sobre el comportamiento oxidativo de la muestra con matriz de maltodextrina.

Comparando las muestras elaboradas a diferentes presiones de homogeneización, el aumento de polímeros y la pérdida total de tocoferoles muestran que el final del periodo de inducción de la fracción de aceite libre tuvo lugar antes en la muestra ML70 (79 - 87 días) que en la muestra ML15 (107 - 114 días). Sin embargo, al igual que lo encontrado para las muestras lácteas, la oxidación de la muestra preparada a menor presión de homogeneización, ML15, fue más rápida que la de la muestra ML70 durante los primeros estadios del desarrollo oxidativo, en ambas fracciones de aceite. En este sentido, el IP aumentó más rápidamente en la muestra ML15 (**Figura 4.21A**).

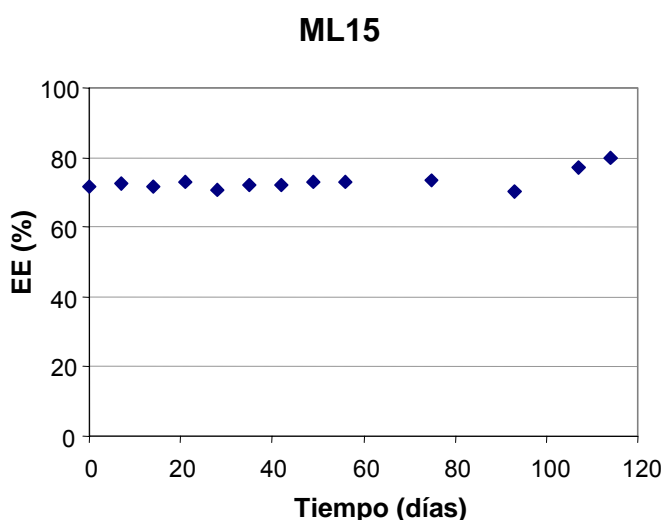


Figura 4.22 - Evolución de la eficacia de encapsulación (EE) de la muestra ML15 durante el almacenamiento a 30 °C, 0 % HR y oscuridad.

En general, las muestras preparadas con menor presión de homogeneización (15 MPa) presentaron una estabilidad oxidativa muy baja en relación con las preparadas a mayor presión (70 MPa). Durante los primeros estadios del desarrollo oxidativo el IP aumentó más rápidamente en las muestras preparadas a menor presión de homogeneización, tanto en la fracción de aceite libre como encapsulado. Por otra parte, la matriz de encapsulación no resultó ser efectiva como barrera física a la difusión de oxígeno, ya que la velocidad de oxidación global fue similar en ambas fracciones de aceite durante las primeras etapas de oxidación y más alta en la fracción encapsulada a partir de un cierto periodo de almacenamiento (21 días).

El aumento de presión no tuvo un efecto significativo en la EE de la muestra láctea, mientras que dio lugar a un importante aumento en la muestra de matriz de maltodextrina. Por otra parte, el aumento de presión disminuyó considerablemente el tamaño promedio de gotas de aceite y el rango de tamaños en la muestra láctea, aunque no se encontró un

efecto significativo en la muestra de maltodextrina, que presentó valores relativamente elevados de los dos parámetros. Como resultado, no se puede atribuir directamente la disminución de la estabilidad oxidativa de las muestras preparadas a menor presión al tamaño de gotas de aceite.

En relación con el tamaño promedio de gotas, su influencia en la oxidación lipídica de aceites microencapsulados es prácticamente desconocida. Algunos autores indican que la susceptibilidad a la oxidación en aceites microencapsulados disminuye cuanto menor es el tamaño de glóbulo de aceite (Minemoto *et al.*, 2002a, b; Watanabe *et al.*, 2002). Sin embargo, estos autores no consideraron el efecto paralelo de los cambios en la matriz de encapsulación introducidos para la obtención de muestras con distintos tamaños de gotas y las variaciones en la EE resultantes.

En estudios preliminares en nuestro laboratorio, en colaboración con Heinzelmann y Knute (Heinzelmann *et al.*, 2000), no se observaron diferencias en la estabilidad oxidativa del aceite total extraído de muestras de aceite de pescado microencapsulado en matriz láctea obtenidas por liofilización tras la preparación de emulsiones a 10 y 40 MPa, aunque el aumento de la presión de homogeneización disminuyó el tamaño promedio y dispersión de tamaños de gotas de aceite e incrementó la EE.

Tabla 4.20- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz láctea (15 MPa) liofilizada.

| Láctea Liofilizada LL15 | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 8,3 | 770 | 0,7 | 0 | 5,7 | 748 | 0,6 |
| 7 | 36 | | 1,0 | 7 | 36 | 746 | 1,4 |
| 14 | 108 | | 1,0 | 14 | 75 | 723 | 1,5 |
| 21 | 124 | | 1,2 | 21 | 149 | 718 | 1,6 |
| 28 | 160 | 742 | 1,0 | 28 | 178 | | 1,7 |
| 35 | 178 | | 1,3 | 35 | 211 | | 1,8 |
| 42 | 232 | 647 | 1,5 | 42 | 239 | 701 | 2,0 |
| 49 | 237 | 592 | 1,5 | 49 | 273 | 660 | 3,0 |
| 56 | 260 | | 2,0 | 56 | 285 | 619 | 4,0 |
| 75 | 279 | 369 | 2,1 | 75 | 315 | 472 | 4,5 |
| 93 | 304 | 176 | 2,0 | 93 | 904 | 312 | 4,7 |
| 107 | 361 | 121 | 2,4 | 107 | | 234 | 4,8 |
| 114 | 489 | 57 | 5,0 | 114 | | 200 | 6,2 |
| 121 | 560 | 0 | 7,1 | 121 | | 0 | 9,0 |
| 128 | 1168 | | 9,8 | 128 | | | 12,7 |
| 135 | | | 21,0 | 135 | 1128 | | 19,8 |
| 139 | | | 39,8 | 139 | | | 30,1 |

Tabla 4.21- Evolución de la oxidación de la muestra de matriz de maltodextrina (15 MPa) liofilizada.

| Maltodextrina Liofilizada ML15 | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 10,5 | 672 | 0,8 | 0 | 5,9 | 680 | 0,7 |
| 7 | 80 | 575 | 1,0 | 7 | 56 | 653 | 1,6 |
| 14 | 140 | 547 | 1,1 | 14 | 120 | | 1,6 |
| 21 | 192 | | 1,2 | 21 | 198 | 600 | 1,6 |
| 28 | 196 | 520 | 1,2 | 28 | 260 | 589 | 1,6 |
| 35 | 208 | | 1,4 | 35 | 278 | 605 | 1,7 |
| 42 | 220 | | 1,6 | 42 | 332 | 600 | 1,9 |
| 49 | 236 | 454 | 1,7 | 49 | 359 | 580 | 3,0 |
| 56 | 281 | 446 | 2,0 | 56 | 380 | | 3,1 |
| 75 | 322 | 305 | 2,2 | 75 | 422 | 558 | 3,2 |
| 93 | 340 | 214 | 2,5 | 93 | 1198 | 547 | 3,2 |
| 107 | 428 | 9 | 2,7 | 107 | | | 5,5 |
| 114 | 484 | 0 | 3,1 | 114 | | | 6,0 |
| 121 | 597 | | 3,2 | 121 | | 450 | 6,3 |
| 128 | 1168 | | 8,5 | 128 | | 283 | 10,0 |
| 135 | | | 8,5 | 135 | | 0 | 15,0 |
| 139 | | | 9,0 | | | | |
| 145 | | | 12,1 | | | | |
| 147 | | | 14,0 | | | | |
| 152 | | | 17,4 | | | | |

4.2.3.- Evaluación conjunta de la influencia del tipo de matriz, presión de homogeneización y método de secado en el comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores han mostrado que el índice de peróxidos puede ser una medida útil para evaluar la oxidación de las fracciones de aceite libre y encapsulado durante los primeros estadíos del desarrollo oxidativo, cuando la polimerización en ambas fracciones es baja, inferior al 1 % p/p. Se ha establecido arbitrariamente como límite un valor de IP igual a 100 meq/kg, que corresponde a un nivel de oxidación del 4,5 % p/p. En este apartado se utiliza el tiempo empleado para alcanzar este nivel de oxidación como medida de la estabilidad oxidativa.

En la **Figura 4.23** se representan los resultados obtenidos en las fracciones de aceite libre y encapsulado de todas las muestras estudiadas. Con fines comparativos, también se ha incluido el resultado obtenido para el aceite en fase continua. Los resultados muestran que el aumento de presión, de 15 a 70 MPa, ejerció un aumento de la estabilidad oxidativa en ambos tipos de muestra, láctea y de maltodextrina. Por otra parte, el procedimiento de secado ejerció un efecto muy significativo sobre la velocidad de oxidación de la muestra láctea, aumentando la estabilidad de las dos fracciones de aceite, libre y encapsulado, con el procedimiento de atomización frente al de liofilización. Por el contrario, para la muestra de maltodextrina no se encontró un efecto significativo en la estabilidad oxidativa de la fracción encapsulada, y durante los primeros estadíos del desarrollo oxidativo la oxidación de la fracción de aceite libre fue más rápida en la muestra atomizada. En general todas las muestras de maltodextrina mostraron una oxidación temprana muy rápida en la fracción de aceite libre, limitando considerablemente la vida útil del producto. Por tanto, las muestras de maltodextrina fueron, desde un punto de vista práctico, menos estables que las muestras lácteas.

Por otra parte, los resultados también ilustran que en las muestras preparadas a menor presión la matriz de encapsulación no fue efectiva en la protección de la fracción encapsulada, ya que en ambas fracciones se alcanzó prácticamente al mismo tiempo el límite de oxidación establecido. También se obtuvieron resultados similares para la muestra láctea preparada a 70 MPa y obtenida mediante liofilización; sin embargo, con respecto al aceite en fase continua, la oxidación de ambas fracciones de aceite fue más lenta. Para el resto de las muestras, LA70, ML70 y MA70, la oxidación global fue más rápida en la fracción de aceite libre y, por consiguiente, la matriz de encapsulación sí fue efectiva como barrera física a la difusión de oxígeno. No obstante, es necesario indicar que con excepción de la muestra LA70, la fracción encapsulada de las muestras en las que la matriz fue efectiva mostró una pequeña subfracción de aceite cuya oxidación fue mucho

más rápida que la de la fracción de aceite libre. De hecho, durante el periodo de inducción de la fracción de aceite libre se observó un ligero aumento progresivo de polímeros en la fracción encapsulada de ML70 y MA70. Por tanto, se puede decir que el método de secado por atomización en la muestra láctea preparada a 70 MPa de presión dio lugar a la muestra más estable desde el punto de vista oxidativo.

Si consideramos que las diferencias en la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado se debieron a propiedades puramente físicas, resulta evidente que las implicadas en la capacidad aislante de la matriz de encapsulación, como la porosidad y/o permeabilidad al oxígeno, son las más determinantes. Lamentablemente, en este estudio no se realizaron medidas de porosidad, ni de permeabilidad, que pudieran explicar los resultados obtenidos; sin embargo, la cantidad de aceite libre encontrada fue consistente con los resultados de estabilidad hallados para la fracción encapsulada, encontrándose una buena correlación lineal en la matriz láctea ($r = -0,999$) y también en la de maltodextrina ($r = -0,986$). Cuanto menor fue la cantidad de aceite libre mayor fue la estabilidad oxidativa de la fracción encapsulada. La cantidad de aceite libre depende de la capacidad del disolvente para extraer la fracción de aceite superficial y gotas de aceite en capas más internas. Por tanto, la cantidad de aceite libre puede ser una medida indirecta de la capacidad aislante de la matriz de encapsulación, al menos para el disolvente de extracción.

El aumento de presión de homogeneización dio lugar a una disminución significativa de la cantidad de aceite libre en ambas matrices, láctea y de maltodextrina. Asimismo, frente al secado por liofilización, el proceso de atomización causó una importante disminución de la cantidad de aceite libre en la matriz láctea, mientras que prácticamente no tuvo ningún efecto en la matriz de maltodextrina, incluso cuando se produjo una importante desestabilización de la emulsión como consecuencia del secado. Si consideramos que la cantidad de aceite libre puede ser una medida indirecta de la capacidad aislante de la matriz, estos resultados explicarían el aumento de estabilidad oxidativa en la matriz láctea y el hecho de que no se observaran cambios en la matriz de maltodextrina (**Figura 4.23**). En el análisis de componentes principales se vio que el secado tuvo una gran influencia en las propiedades físicas inherentes a la matriz de encapsulación, tanto en la muestra láctea como en la de maltodextrina. En ambas matrices se observó que la solubilidad fue uno de los parámetros más afectados por el secado, encontrándose una disminución significativa con el proceso de atomización. La disminución de solubilidad observada puede ser atribuida a una menor capacidad de rehidratación debida a una menor porosidad de la pared sólida (Sims, 1994; Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

Con respecto a la estabilidad oxidativa de la fracción de aceite libre, se observa la misma tendencia que la de la fracción encapsulada en la matriz láctea, aumentando con la presión y al pasar de liofilización a atomización. En la matriz de maltodextrina también se observa la misma tendencia, aunque la oxidación fue más rápida en la muestra atomizada que en la liofilizada durante las primeras etapas del desarrollo oxidativo.

En diferentes estudios se ha sugerido que la fracción de aceite superficial constituye la fracción mayoritaria del aceite libre, que recubre una gran superficie de la partícula y que está formada por gotas de tamaños más grandes o depósitos discretos de aceite originados por coalescencia entre gotas o por la desestabilización de la interfase (Buma, 1971a, b; Gejl-Hansen and Flink, 1977; Drusch *et al.*, 2007, 2008; Vignolles, 2009b). Las gotas inmersas en capas más internas se encuentran completamente rodeadas por una capa interfacial, la cual ejerce un papel protector como barrera física a la difusión de oxígeno y, por consiguiente, afecta a la estabilidad oxidativa de la fracción de aceite libre (Drusch *et al.*, 2007). Por tanto, se puede decir que, por un lado, la fracción de aceite libre está formada por una fracción más estable desde el punto de vista oxidativo, constituida por gotas en capas más internas, y, por otro, por la fracción superficial, que se encuentra en contacto directo con el aire. Para explicar la pobre correlación encontrada entre la estabilidad oxidativa, determinada sobre la fracción total de aceite, y la cantidad de aceite libre en diferentes muestras de microencapsulados, Drusch y colaboradores (2007) han sugerido que la cantidad de aceite superficial, y no la de la fracción total de aceite libre, es la responsable de una mayor oxidación. De hecho, muestras con un mayor contenido de aceite libre presentaron mayor estabilidad oxidativa que otras con menor cantidad, y lo contrario también fue observado.

Los resultados de estabilidad oxidativa de la fracción de aceite libre obtenidos en esta Tesis podrían ser explicados por la distribución del aceite libre en la partícula, como sugiere Drusch y colaboradores (2007). Para las muestras lácteas se ha observado que la estabilidad oxidativa aumenta con la disminución de la cantidad de aceite libre y con la disminución del tamaño de gotas, lo que sugiere también una disminución de la cantidad de aceite superficial poco estable. En cuanto a las muestras de matriz de maltodextrina, se observa la misma tendencia que la mostrada por las muestras lácteas, aunque se produjo una oxidación temprana más rápida en la muestra atomizada. El proceso de atomización en la muestra de matriz de maltodextrina causó una gran desestabilización de la emulsión debido a su baja estabilidad. Los resultados parecen indicar que gotas grandes poco estabilizadas por el emulsionante son menos estables desde el punto de vista oxidativo que gotas pequeñas completamente protegidas por la capa interfacial.

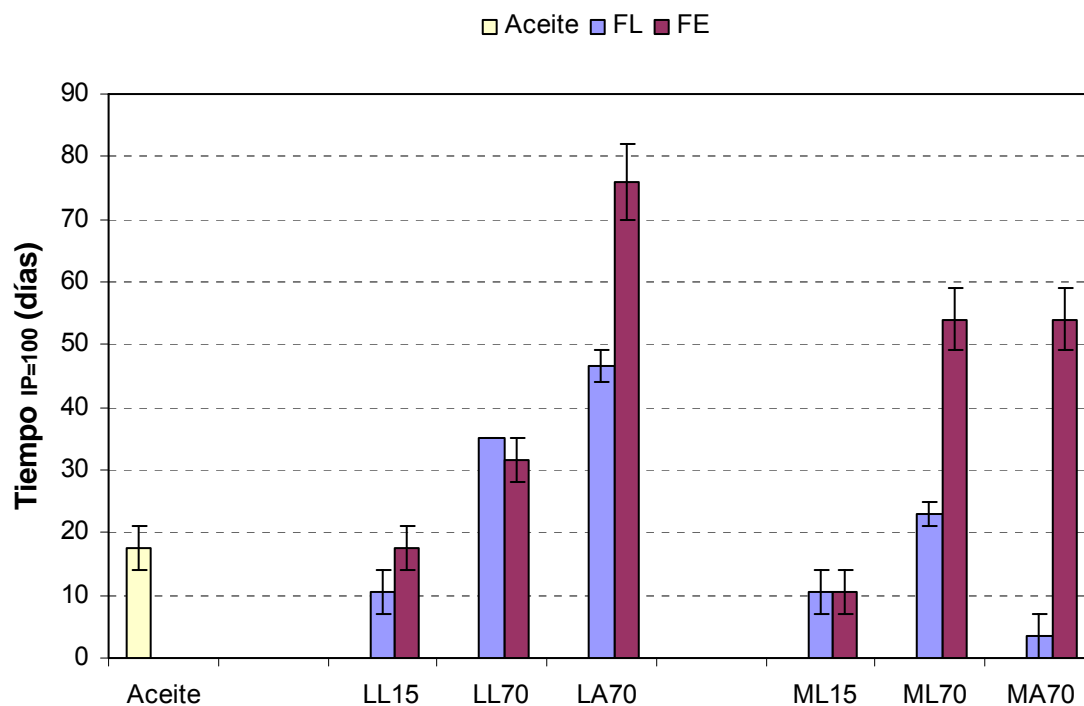


Figura 4.23 – Tiempo de almacenamiento necesario para alcanzar un valor de índice de peróxidos de 100 meq/kg. FL, Fracción de aceite libre. FE, Fracción de aceite encapsulado. Los resultados muestran la mediana y las barras de error expresan los límites del índice de peróxidos fijados por tres desmuestres consecutivos.

Resumen de resultados

Independientemente del tipo de matriz (láctea o de maltodextrina), de la presión de homogeneización (15 ó 70 MPa) y del tipo de secado (liofilización o atomización) los resultados de este estudio han puesto de manifiesto que la oxidación de la fracción de aceite libre en los aceites microencapsulados tuvo lugar de forma análoga a aceites en fase continua (oxidación continua), mientras que la fracción de aceite encapsulado mostró un comportamiento de oxidación discontinua. En este sentido, la fracción de aceite libre presentó un periodo de baja oxidación, denominado periodo de inducción, cuyo final estuvo marcado por la pérdida total de los antioxidantes (tocoferoles) y el inicio de la formación sustancial de los compuestos de oxidación avanzada, los compuestos de polimerización. Por tanto, los compuestos de polimerización no se formaron en cantidades elevadas hasta que tuvo lugar la pérdida total de los tocoferoles. Sin embargo, la fracción encapsulada mostró cantidades elevadas de compuestos de polimerización en muestras con aún niveles relativamente altos de tocoferoles. Este comportamiento puede ser atribuido a gotas de aceite que se oxidan a velocidades de reacción muy diferentes. Como resultado, la fracción encapsulada estuvo formada por, en un extremo, gotas de aceite con baja oxidación, muy protegidas por la matriz de encapsulación y con cantidades elevadas de tocoferol, y, en otro, por gotas en estados de oxidación avanzada, es decir, gotas que han perdido por completo los tocoferoles y con cantidades elevadas de compuestos de polimerización.

Los resultados obtenidos han mostrado que el índice de peróxidos puede ser una medida útil para evaluar la oxidación relativa de las fracciones de aceite libre y encapsulado sólo durante los primeros estadios del desarrollo oxidativo, cuando la polimerización en ambas fracciones es baja, inferior al 1 % p/p. De forma arbitraria, en este estudio se ha establecido como límite un valor de IP igual a 100 meq/kg, que corresponde a un nivel de oxidación del 4,5 % p/p (considerando un peso molecular de 900 para hidroperóxidos). En general, la oxidación lipídica en alimentos sometidos a temperatura ambiente no suele alcanzar un nivel superior al 5 % p/p sobre materia grasa, debido a que a estos niveles la rancidez oxidativa es fácilmente detectada. El límite de oxidación establecido (IP = 100 meq/kg) se encuentra por debajo del momento en el que se produce la polimerización sustancial en la fracción de aceite libre (final del periodo de inducción), y cuando la polimerización de la fracción encapsulada es inferior al 1 % p/p.

El aumento de presión de homogeneización, de 15 a 70 MPa, ejerció un aumento de la estabilidad oxidativa en las fracciones de aceite libre y encapsulado de ambos tipos de muestra, láctea y de maltodextrina. Por otra parte, el procedimiento de secado ejerció un efecto muy significativo sobre la estabilidad oxidativa de la muestra láctea, aumentando en las dos fracciones de aceite, libre y encapsulado, con el procedimiento de atomización frente al de liofilización. Por el contrario, para la muestra de maltodextrina no se encontró un efecto significativo en la estabilidad oxidativa de la fracción encapsulada, y durante los primeros estadios del desarrollo oxidativo la oxidación de la fracción de aceite libre fue más rápida en la muestra atomizada. En general todas las muestras de maltodextrina mostraron una oxidación temprana muy rápida en la fracción de aceite libre, limitando considerablemente la vida útil del producto. Por tanto, las muestras de maltodextrina fueron, desde un punto de vista práctico, menos estables que las muestras lácteas. Además, la matriz de maltodextrina también fue menos estable desde el punto de vista estructural, como indicaba su menor valor de T_g , ya que, a diferencia de lo encontrado en las muestras lácteas, se observaron cambios en la EE, o, lo que es lo mismo, en la distribución de aceite en la matriz de encapsulación, durante el almacenamiento.

Los resultados obtenidos de estabilidad oxidativa en la fracción encapsulada podrían ser explicados por una mayor capacidad aislante de la matriz de encapsulación con el aumento de presión y al pasar de muestras liofilizadas a atomizadas. Con respecto a la fracción de aceite libre, los valores de estabilidad oxidativa siguen la misma tendencia que la observada en la fracción encapsulada y podrían ser explicados en función de la localización del aceite en la partícula. Los resultados sugieren que gotas pequeñas, completamente recubiertas por la pared interfacial y localizadas en capas más internas, confieren estabilidad oxidativa frente a gotas de mayor tamaño, poco estabilizadas por el emulsionante y situadas en la superficie de la partícula.

4.3.- OXIDACIÓN DE ACEITES MICROENCAPSULADOS EN ALIMENTOS

En este apartado se incluyen los estudios de oxidación realizados en aceites microencapsulados de dos alimentos que han sido seleccionados por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y, por tanto, elevada susceptibilidad a la oxidación lipídica:

- a) Producto lácteo en polvo en fase de pre-comercialización, obtenido por atomización de un producto lácteo líquido que contiene leche descremada y un aceite rico en ácido linoleico conjugado (CLA).
- b) Fórmulas infantiles en polvo comerciales, obtenidas por atomización de emulsiones con una compleja composición que incluye aceites vegetales.

4.3.1.- Producto lácteo en polvo con aceite rico en CLA (aceite Tonalin®)

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 1.1.1.3.), CLA es un acrónimo que engloba a un conjunto de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico conjugado que originariamente se encontraban, sólo y de forma minoritaria, en la carne procedente de rumiantes y en los productos. A raíz de atribuirse al isómero *trans*-10, *cis*-12-ácido linoleico efectos beneficiosos para la salud relacionados con la pérdida de peso y el aumento de la masa muscular (Malpuech-Bruguere *et al.*, 2004; Whigham *et al.*, 2007), los preparados comerciales de CLA se han extendido en una variedad de suplementos y alimentos. En España, la empresa CAPSA comercializó hace unos años una línea de productos lácteos funcionales enriquecidos con CLA. Dicha línea será ampliada próximamente con la inclusión de un producto, similar a la leche en polvo, obtenido por atomización del producto lácteo ya comercializado que contiene leche descremada y el aceite Tonalin®, rico en CLA. Este producto está, por tanto, constituido por aceite Tonalin® microencapsulado en una matriz láctea.

Los aceites empleados en enriquecer productos lácteos presentan en su composición de ácidos grasos aproximadamente 80 % de una mezcla a partes iguales de los dos isómeros biológicamente activos (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12). Uno de los aceites más empleados es el aceite Tonalin® TG 80, distribuido por Cognis S.A. y obtenido a partir de un aceite rico en ácido linoleico, el aceite de cártamo, mediante isomerización alcalina (Villeneuve *et al.*, 2005). El aceite Tonalin® TG 80 está constituido mayoritariamente por triglicéridos (aproximadamente 80%) y diglicéridos (aproximadamente 20%). Según especificaciones de la composición en ácidos grasos del aceite, el contenido total de CLA se encuentra entre 78 y 84%, el contenido en ácido oleico entre 10 y 20%, y los contenidos de ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico *cis*-9, *cis*-12 (no conjugado) no deben ser superiores a 4, 4 y 3%, respectivamente. Como

antioxidantes, contiene una mezcla de diferentes tipos de tocoferol al 0,1% (70% de actividad mínima).

4.3.1.1. Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin[®] (fase continua)

En primer lugar se realizó un ensayo para evaluar el desarrollo de la oxidación en el aceite Tonalin[®] TG 80. Con fines comparativos, se evaluó en paralelo la oxidación de un aceite de cártamo, con contenido en ácido linoleico no conjugado similar al de CLA en el aceite Tonalin[®] TG 80. En la tabla de caracterización de los aceites (**Tabla 4.22**), se observa que el aceite Tonalin[®] contiene una proporción similar de los isómeros conjugados de ácido linoleico *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12. El aceite Tonalin[®] presentó una cantidad total de tocoferoles superior a la del aceite de cártamo, siendo γ -tocoferol el mayoritario, mientras que el aceite de cártamo sólo contenía α -tocoferol. Sin embargo, la estabilidad oxidativa fue similar para ambos aceites.

Los valores de índice de peróxidos y de compuestos de polimerización fueron similares para ambos aceites, aunque ligeramente superiores para el aceite de cártamo.

La evolución oxidativa de los dos aceites (cártamo y Tonalin[®]) en fase continua se determinó a 30 °C y en oscuridad. Se almacenaron 10 g de cada aceite en 2 vasos de precipitado de 1 L (relación S/V= 9,8 cm⁻¹). Para la evaluación de la oxidación se utilizaron los mismos métodos empleados en los experimentos anteriores. La **Tabla 4.23** y la **Figura 4.24** muestran la evolución de la oxidación.

Tabla 4.22 - Caracterización inicial de los aceites de cártamo y Tonalin®.

| | Aceite de cártamo | Aceite Tonalin® |
|---|-------------------|-----------------|
| Composición en ácidos grasos (%): | | |
| 16:0 | 7,2 ± 0,04 | 2,4 ± 0,03 |
| 18:0 | 2,6 ± 0,03 | 2,6 ± 0,05 |
| 18:1 | 13,7 ± 0,13 | 14,2 ± 0,15 |
| 18:2 9c, 12c | 74,7 ± 0,38 | |
| 18:2 9c, 11t | | 39,2 ± 0,45 |
| 18:2 10t, 12c | | 38,6 ± 0,42 |
| Otros | 1,8 ± 0,02 | 3,0 ± 0,02 |
| Composición en tocoferoles (mg/kg): | | |
| α | 370 ± 9 | 81 ± 4 |
| γ | | 416 ± 10 |
| δ | | 235 ± 8 |
| Índice de peróxidos (meq O₂/kg) | 3,1 ± 0,2 | 2,5 ± 0,2 |
| Dímeros + Polímeros (%) | 1,1 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |
| Estabilidad oxidativa a 100°C (h) | 5,81 ± 0,04 | 5,74 ± 0,04 |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de 3 muestras.

Tabla 4.23 - Evolución de la oxidación de los aceites de cártamo y Tonalin®.

| Aceite de cártamo | | | | Aceite Tonalin® | | | |
|-------------------|-------------|-------------------|---------|-----------------|-------------|-------------------|---------|
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) |
| 0 | 3,0 | 370 | 1,1 | 0 | 3,0 | 732 | 0,6 |
| 4 | 7,2 | 361 | 1,1 | 4 | 3,2 | 722 | 0,9 |
| 8 | 6,0 | 342 | 1,1 | 8 | 3,0 | 660 | 1,5 |
| 12 | 8,1 | 333 | 1,3 | 12 | 4,3 | 613 | 2,0 |
| 16 | 10 | 324 | 1,3 | 16 | 4,1 | 586 | 2,5 |
| 20 | 10 | 315 | 1,4 | 20 | 5,0 | 567 | 3,1 |
| 24 | 13 | 305 | 1,4 | 24 | 5,0 | 549 | 3,8 |
| 28 | 13 | 296 | 1,5 | 28 | 6,0 | 531 | 3,9 |
| 32 | 15 | 278 | 1,5 | 32 | 6,4 | 519 | 4,0 |
| 36 | 16 | 259 | 1,8 | 36 | 6,2 | 492 | 4,1 |
| 44 | 16 | 185 | 1,9 | 44 | 6,1 | 492 | 4,2 |
| 48 | 18 | 167 | 1,8 | 48 | 6,0 | 443 | 4,3 |
| 60 | 20 | 130 | 1,9 | 60 | 7,1 | 378 | 4,4 |
| 76 | 35 | 56 | 2,0 | 76 | 7,2 | 248 | 4,6 |
| 104 | 78 | 28 | 2,9 | 104 | 7,1 | 148 | 5,0 |
| 120 | 120 | 0 | 3,2 | 120 | 8,0 | 51 | 7,0 |
| 140 | 170 | | 8,0 | 140 | 11 | 0 | 14,0 |

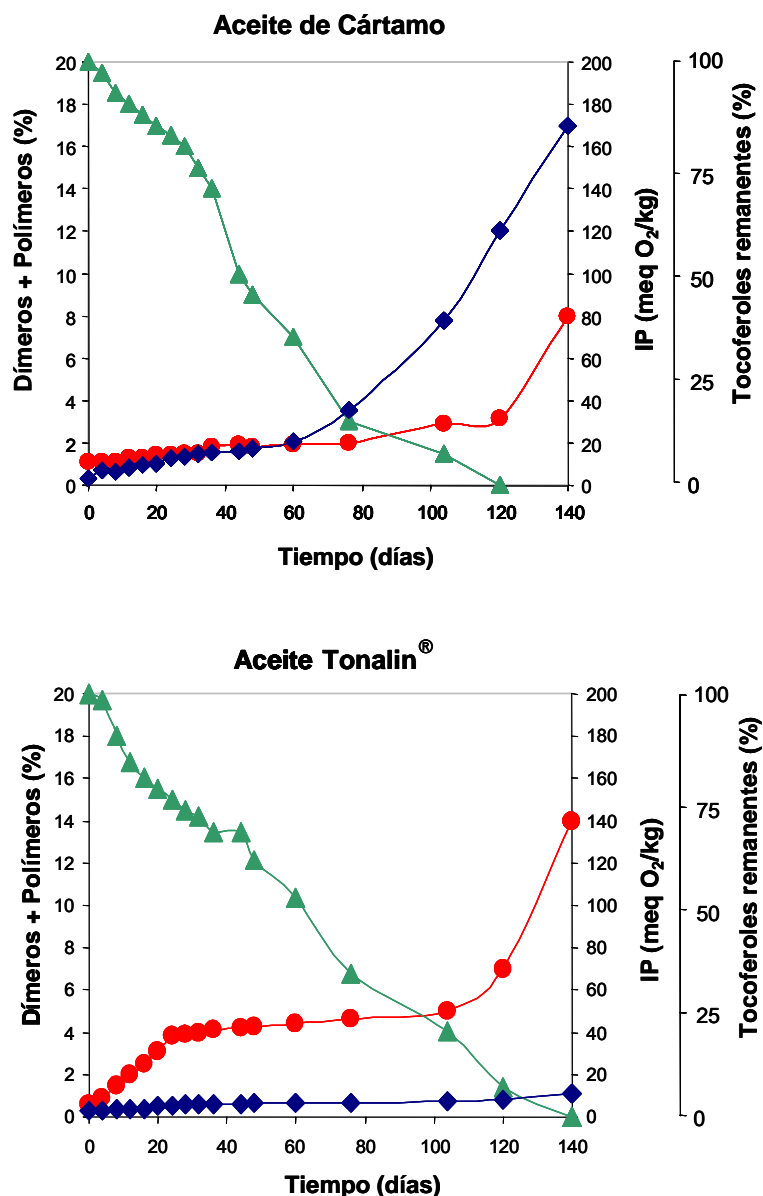


Figura 4.24 - Evolución de la oxidación en los aceites de cártamo y Tonalin® a 30 °C y oscuridad.

Índice de peróxidos (IP) (◆), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

Como era de esperar, en el aceite de cártamo se observó desde el principio un aumento progresivo del índice de peróxidos, y cuando alcanzó un valor de 120 meq O₂/kg, se detectó la aparición de rancidez. En ese punto ya se habían agotado los tocoferoles y el nivel de polímeros fue de 3,2 %. En cambio, el aceite Tonalin® mostró un comportamiento oxidativo muy diferente. Desde la etapa inicial de oxidación, el índice de peróxidos se mantuvo muy bajo, mientras que los compuestos de polimerización experimentaron un incremento significativo. Por ejemplo, cuando se agotaron los tocoferoles (140 días) y el índice de peróxidos fue de sólo 11 meq O₂/kg, la cantidad de los compuestos de polimerización constituyó el 14% de la muestra.

En estas muestras no pudo detectarse la aparición de rancidez, lo cual puede estar relacionado con el diferente perfil de volátiles obtenido en este aceite, tal y como se ha publicado recientemente (García-Martínez *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos indican que en el aceite Tonalin[®], rico en CLA, la formación de polímeros, posiblemente con uniones tipo peróxido, está favorecida frente a la formación de hidroperóxidos. La formación de polímeros en los primeros estadios de la oxidación se ha observado anteriormente en ensayos realizados con ésteres metílicos de los dos isómeros mayoritarios en el aceite de Tonalin[®] (9*c*,11*t* y 10*t*,12*c*) (Luna *et al.*, 2007) y apoyan la hipótesis sobre las diferencias de cinética de oxidación entre sustratos con dobles enlaces conjugados y no conjugados (Brimberg y Kamal-Eldin, 2003). Por tanto, el control del estado de oxidación de aceites ricos en CLA no debería ser realizado exclusivamente en base al índice de peróxidos, tal y como está establecido actualmente.

4.3.1.2. Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin[®] microencapsulado (TM)

Según las indicaciones del fabricante, las condiciones de preparación del aceite Tonalin[®] microencapsulado (TM) consistieron en la adición de aceite Tonalin[®] a leche desnatada (1 %, p/v), homogeneización con 2 pases a 20 MPa, esterilización mediante el proceso UHT indirecto (142°C durante 6 segundos) y secado por atomización (condiciones no reveladas). Teóricamente, el producto seco contendría aproximadamente 10% grasas (requerimiento mínimo de 6% Tonalin[®]), 36% de proteínas y 54% de hidratos de carbono.

La empresa suministró muestras de dos lotes, elaborados con los mismos ingredientes y mediante el mismo procedimiento, TM 1 y TM 2. Las muestras fueron almacenadas a 30 °C, en oscuridad y a sequedad, es decir, en las mismas condiciones que las utilizadas para los sistemas modelos de aceites de girasol microencapsulado.

En la **Tabla 4.24** se muestran las principales características fisicoquímicas evaluadas en las muestras iniciales. Las **Figuras 4.25** y **4.26** recogen las curvas de frecuencia de tamaños de glóbulos de aceite (A) y las curvas DSC (B) de las muestras TM1 y TM2, respectivamente.

El contenido de aceite en ambos lotes fue similar, alrededor de un 8%, aunque inferior al esperado teóricamente. Las únicas características significativamente diferentes entre ambos lotes fueron la eficacia de encapsulación y la temperatura de transición vítrea, ambas superiores en TM 2.

Tabla 4.24 - Características fisicoquímicas de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1 y TM 2.

| | TM 1 | TM 2 |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Distribución lipídica: | | |
| Aceite Total (g/100 g AM) | 8,12 ± 0,50 | 8,15 ± 0,45 |
| Aceite Libre (g/100 g AM) | 0,97 ± 0,03 ^a | 0,51 ± 0,02 ^b |
| Eficacia de Encapsulación (%) | 88,0 ± 1,62 ^a | 93,7 ± 1,30 ^b |
| Parámetros de tamaños de glóbulos: (lente 45 mm) | | |
| d _(v, 0,5) (μm) | 0,62 ± 0,01 ^a | 0,74 ± 0,02 ^b |
| d _(v, 0,9) - d _(v, 0,1) (μm) | 10,52 ± 1,26 | 9,31 ± 0,87 |
| D [3,2] (μm) | 0,60 ± 0,04 | 0,58 ± 0,05 |
| ASE (μm ⁻¹) | 10,00 ± 0,14 | 10,34 ± 0,30 |
| Actividad de agua, a_w | 0,20 ± 0,003 | 0,18 ± 0,002 |
| Temperatura de transición vítrea, T_g (°C) | 63,87 ± 0,46 ^a | 75,38 ± 0,62 ^b |
| Parámetros de color: | | |
| L*(D65) | 94,06 ± 0,14 | 94,39 ± 0,11 |
| a*(D65) | -1,73 ± 0,04 | -1,72 ± 0,04 |
| b*(D65) | 11,99 ± 0,14 ^a | 13,32 ± 0,15 ^b |
| Solubilidad, t (s) | 260 ± 0,7 ^a | 230 ± 0,6 ^b |
| pH | 6,7 ± 0,04 | 6,7 ± 0,05 |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de la media de 3 muestras.
 Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Estas muestras tienen en común con las muestras de aceite de girasol microencapsulado en matriz láctea preparadas por atomización en planta piloto (LA70) la similar naturaleza láctea de la matriz y el procedimiento de secado. Aunque no puedan establecerse comparaciones debido a las diferencias existentes entre ambos tipos de muestra en un gran número de variables, es interesante mencionar que el tamaño medio de gotas fue similar para las muestras TM 1 (0,62 μm) y TM 2 (0,74 μm), y sólo ligeramente superior al encontrado en las muestras LA70 (0,48 μm), mientras que los valores de dispersión de gotas fueron mucho más elevados en TM 1 (10,52 μm) y TM 2 (9,31 μm) en comparación con el de LA70 (1,33 μm). Ello puede ser debido en parte a la menor presión aplicada en la preparación de las emulsiones originales de TM 1 y TM 2 (20 MPa) en comparación con la aplicada en la emulsión original de LA70 (70 MPa).

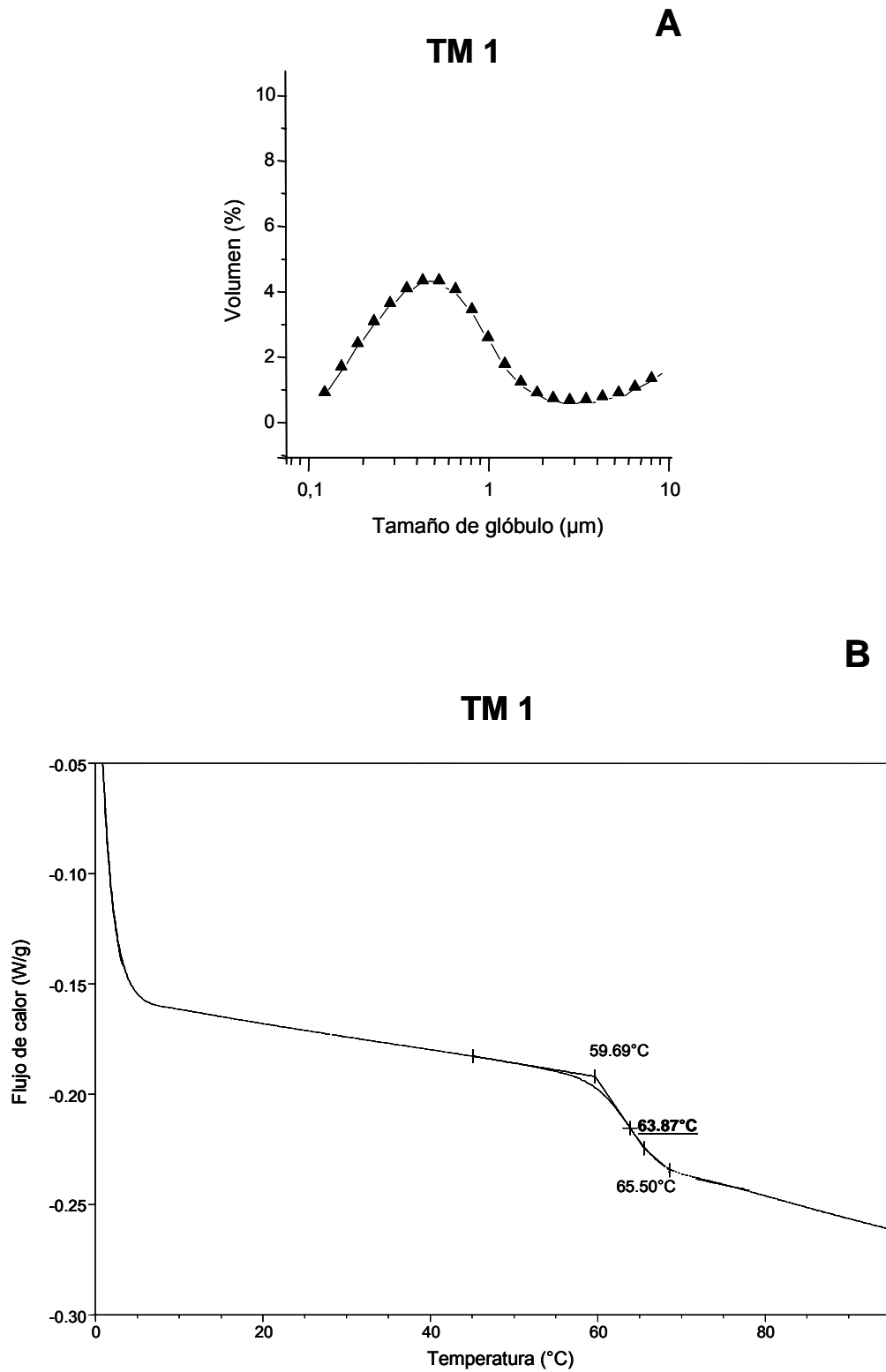


Figura 4.25 - Distribución de tamaños de glóbulos de aceite en la emulsión reconstituida en agua (A) y curva DSC (B) de la muestra TM 1.

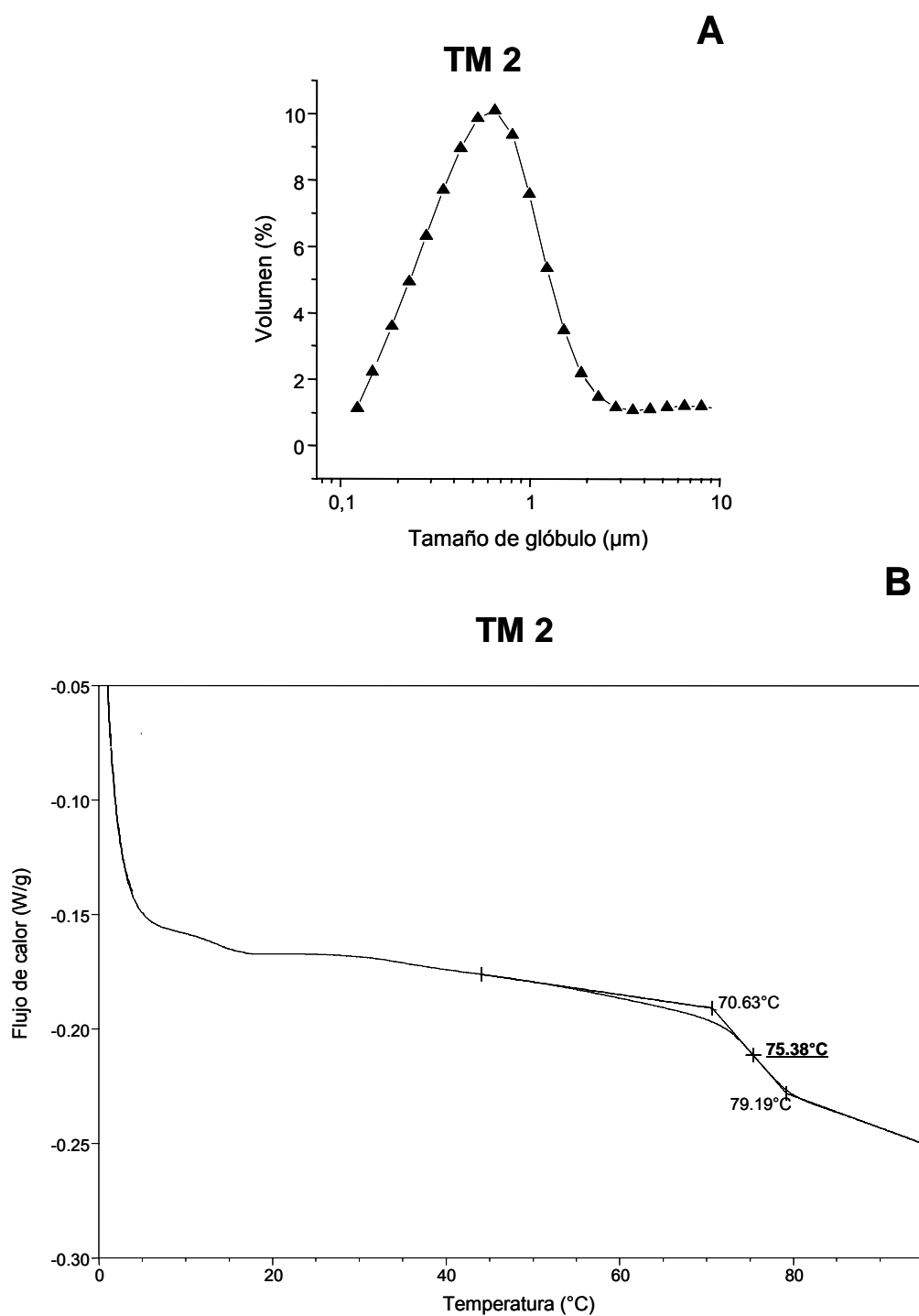


Figura 4.26 - Distribución de tamaños de glóbulos de aceite en la emulsión reconstituida en agua (A) y curva DSC (B) de la muestra TM 2.

La **Tabla 4.25** muestra las principales características iniciales de las fracciones de aceite extraídas de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1 y TM 2.

Tabla 4.25 - Caracterización de los aceites extraídos de las muestras iniciales de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1 y TM 2.

| | TM 1 | | TM 2 | |
|---|-----------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | Libre | Encapsulado | Libre | Encapsulado |
| Composición en ácidos grasos (%) | | | | |
| C16:0 | 6,79 ± 0,24 | 6,55 ± 0,18 | 3,69 ± 0,25 | 3,04 ± 0,21 |
| C18:0 | 5,24 ± 0,16 | 4,12 ± 0,01 | 3,32 ± 0,18 | 2,89 ± 0,02 |
| C18:1 | 14,18 ± 0,03 | 15,20 ± 0,05 | 13,88 ± 0,02 | 14,36 ± 0,05 |
| C18:2 (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i>) | 33,76 ± 0,58 | 34,15 ± 0,67 | 38,42 ± 0,56 | 38,96 ± 0,74 |
| | (10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>) | 34,12 ± 0,36 | 34,18 ± 0,53 | 37,07 ± 0,43 |
| Otros | 5,91 ± 0,25 | 5,80 ± 0,38 | 3,62 ± 0,28 | 3,10 ± 0,15 |
| Tocoferoles (mg/kg) | 502 ± 15 ^a | 691 ± 17 ^b | 683 ± 20 | 720 ± 18 |
| Dímeros + Polímeros (%) | 0,5 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de 3 muestras.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre los valores de las fracciones libre y encapsulada ($p < 0,05$)

En general, las composiciones de ácidos grasos de las muestras TM1 y TM2 muestran claras diferencias con la del aceite Tonalin® (**Tabla 4.22**), particularmente en la proporción de los isómeros CLA, significativamente inferior en TM 1 y TM 2, y las de los ácidos palmítico y esteárico, significativamente superiores en TM 1 y TM 2. Así mismo, se detectaron ácidos de cadena corta y media en TM 1 y TM 2, típicos de la composición de grasa láctea bovina. Esto es debido a la presencia de grasa láctea remanente del proceso de desnatado de la leche utilizada en la elaboración del producto. De hecho, la comparación entre los valores de TM 1 y TM 2 indica mayor contribución de grasa láctea en la muestra TM 1, en la cual los valores de ácido palmítico y esteárico son ligeramente superiores, mientras que los de CLA son inferiores, e incluso se detectaron pequeñas cantidades (0,4%) de ácido linoleico no conjugado, C18:2 9*cis*, 12*cis*. El contenido de tocoferoles totales fue en general inferior al del aceite Tonalin® (**Tabla 4.22**) y se obtuvieron niveles más bajos en la fracción libre que en la encapsulada, tanto en TM 1 como en TM 2.

Las **Tablas 4.26 y 4.27** recogen los resultados correspondientes a la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de las muestras TM 1 y TM 2, respectivamente. Así mismo, las **Figuras 4.27 y 4.28** ilustran la relación entre los parámetros evaluados.

Tabla 4.26 - Evolución de la oxidación de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 1.

| TM 1 | | | | | |
|--------------------------|----------------------|------------|--------------------------------|----------------------|------------|
| Fracción de aceite libre | | | Fracción de aceite encapsulado | | |
| Tiempo (días) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) | Tiempo (días) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) |
| 0 | 500 | 0,5 | 0 | 691 | 0,2 |
| 4 | 222 | 0,7 | 4 | 669 | 0,2 |
| 7 | 192 | 0,7 | 7 | 641 | 0,2 |
| 14 | 109 | 1,6 | 14 | 637 | 0,5 |
| 27 | 25 | 3,6 | 27 | 552 | 0,3 |
| 35 | 0 | 4,6 | 35 | 499 | 0,6 |
| 42 | | 4,8 | 42 | 463 | 0,6 |
| 48 | | 4,8 | 48 | 417 | 2,0 |
| 50 | | 4,9 | 50 | 396 | 1,0 |
| 55 | | 5,0 | 55 | 291 | 2,7 |
| 57 | | 5,4 | 57 | 347 | 2,5 |
| 62 | | 5,1 | 62 | 238 | 5,0 |
| 64 | | 5,6 | 64 | 188 | 7,4 |
| 69 | | 6,0 | 69 | 152 | 7,6 |
| 71 | | 6,8 | 71 | 90 | 7,8 |
| 77 | | 7,4 | 77 | 55 | 8,9 |
| 80 | | 7,5 | 80 | 0 | 9,9 |

Tabla 4.27 - Evolución de la oxidación de las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 2.

| TM 2 | | | | | |
|--------------------------|----------------------|------------|--------------------------------|----------------------|------------|
| Fracción de aceite libre | | | Fracción de aceite encapsulado | | |
| Tiempo (días) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) | Tiempo (días) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) |
| 0 | 683 | 0,5 | 0 | 720 | 0,2 |
| 4 | 342 | 0,8 | 4 | 703 | 0,2 |
| 7 | 287 | 1,0 | 7 | 683 | 0,2 |
| 14 | 123 | 1,5 | 14 | 661 | 0,4 |
| 21 | 34 | 3,5 | 21 | 686 | 0,2 |
| 23 | 0 | 4,5 | 23 | 707 | 0,2 |
| 28 | | 5,0 | 28 | 688 | 0,2 |
| 35 | | 5,2 | 35 | 669 | 0,2 |
| 42 | | 6,0 | 42 | 634 | 0,2 |
| 50 | | 7,9 | 50 | 572 | 0,4 |
| 56 | | 8,3 | 56 | 606 | 0,7 |
| 64 | | 9,0 | 64 | 433 | 0,8 |
| 77 | | 11,2 | 77 | 378 | 2,2 |
| 91 | | 12,5 | 91 | 230 | 3,8 |
| 102 | | 14,0 | 102 | 86 | 6,5 |
| 120 | | nd | 120 | 0 | 8,2 |
| 134 | | 19,7 | 134 | | 10,0 |
| 150 | | 20,0 | 150 | | 13,0 |

nd: no determinado

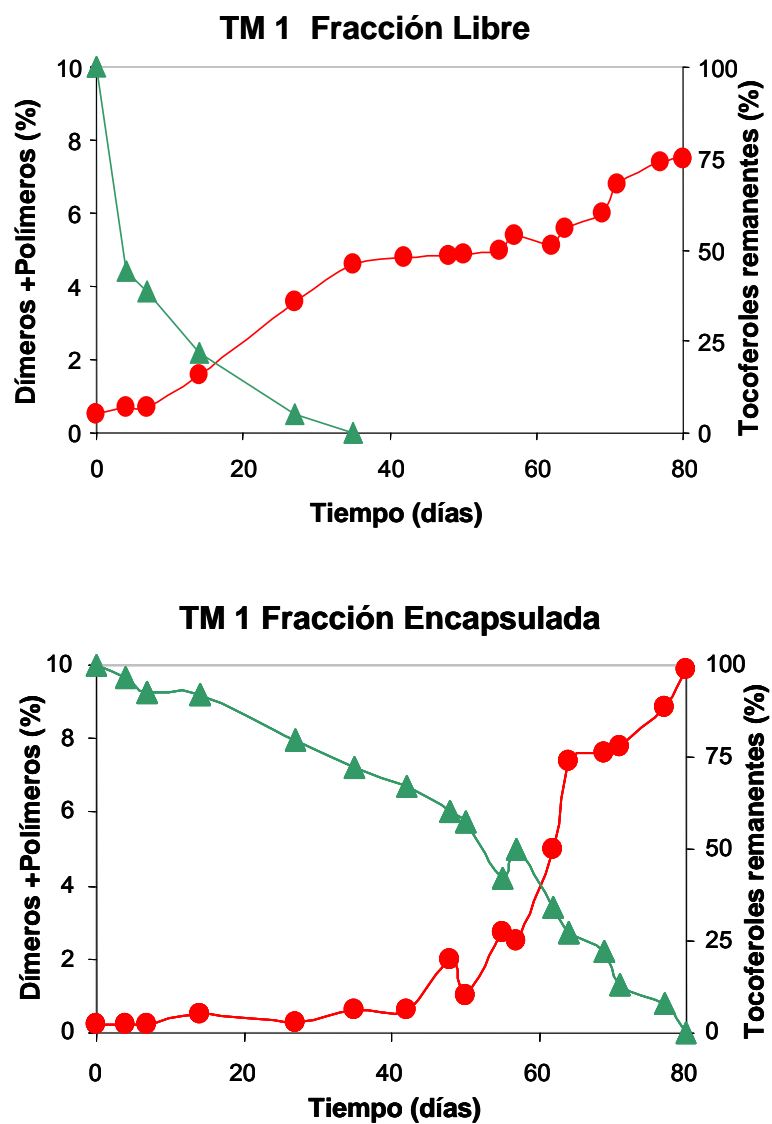


Figura 4.27 - Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 1 almacenadas a 30 °C, HR de 0% y oscuridad. Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

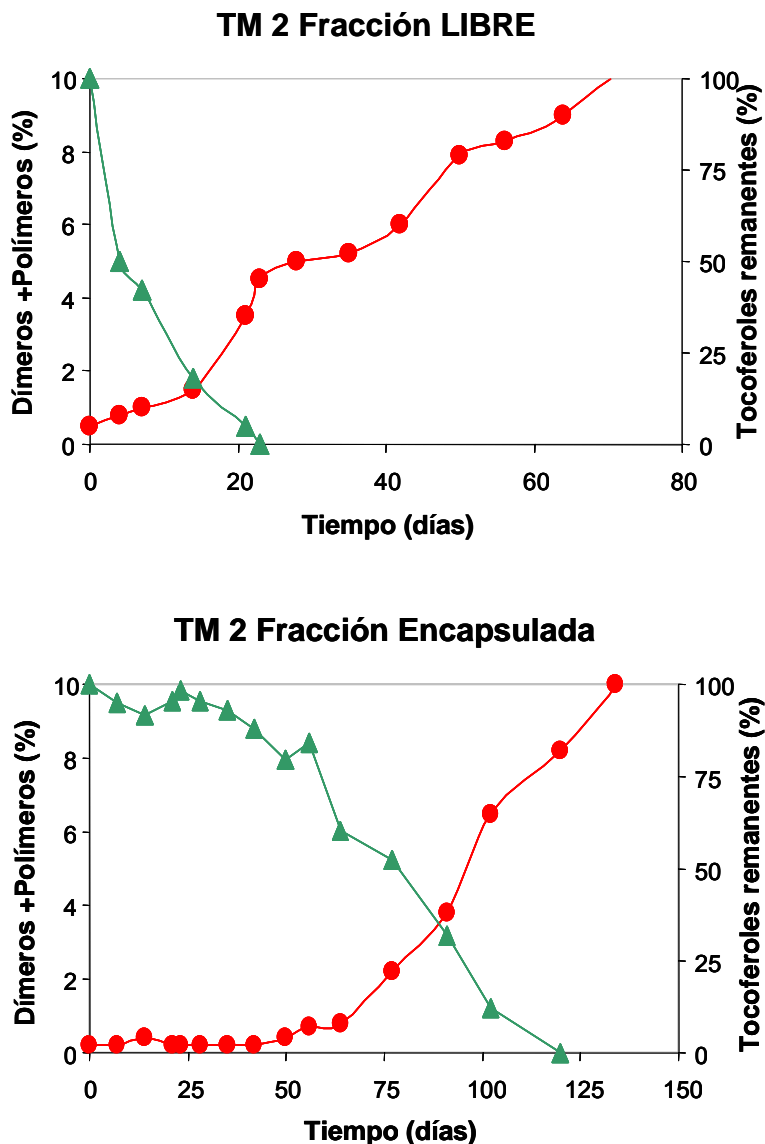


Figura 4.28 - Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 2 almacenadas a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad. Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

El comportamiento oxidativo de las fracciones libre y encapsulada de TM 1 y TM 2 fue similar en cuanto a que la fracción libre se oxidó mucho más rápidamente en ambos casos. En estas muestras no se determinó el índice de peróxidos porque no aporta información útil en sustratos con ácido linoleico conjugado, como se dedujo anteriormente en el caso de la evolución oxidativa del aceite Tonalin® en fase continua. En las fracciones de aceite libre la polimerización comenzó desde los primeros días, en cambio en las fracciones de aceite encapsulado no se encontraron niveles destacables de dímeros y polímeros hasta los 40- 50 días. Este hecho pone de relieve la protección ejercida por la matriz sobre la fracción de aceite encapsulado frente a la oxidación. Los niveles

alcanzados de dímeros y polímeros cuando se agotaron los antioxidantes fueron elevados, aproximadamente del 5% en la fracción de aceite libre y 8-10% en la fracción encapsulada. Además, la proporción de polímeros de elevado peso molecular fue muy elevada, tal y como se ilustra en la **Figura 4.29**, que muestra los cromatogramas obtenidos mediante el análisis directo por HPSEC de las fracciones de aceite libre extraído de la muestra TM1 en el momento inicial y a los 35 días de almacenamiento, cuando se agotaron los tocoferoles.

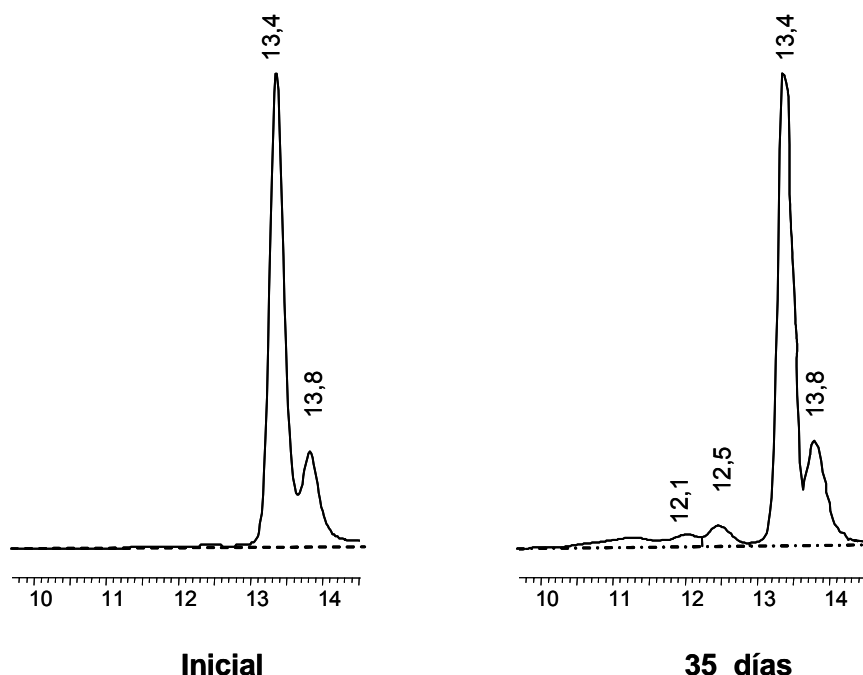


Figura 4.29 - Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones de aceite libre extraído de la muestra TM1 en el momento inicial y a los 35 días de almacenamiento a 30 °C. Tiempos de retención: < 12,5 min, polímeros de triglicéridos; 12,5 min, dímeros de triglicéridos; 13,4 min, monómeros de triglicéridos; 13,8 min, diglicéridos.

El pico mayoritario (13,4 min) corresponde a los triglicéridos, y solapando en parte con éste se encuentra el pico correspondiente a los diglicéridos (13,8 min). Como puede observarse, los compuestos de polimerización, que eluyen a tiempos más cortos, a partir de 10,0 min (tiempo muerto), están mayoritariamente constituidos por polímeros, de peso molecular más elevado que los dímeros de triglicéridos (12,5 min).

Las diferencias encontradas en la relación entre tocoferoles remanentes y las cantidades de dímeros y polímeros entre las fracciones de aceite libre y encapsulado se recogen en la **Figura 4.30**, donde se han incluido ambas muestras.

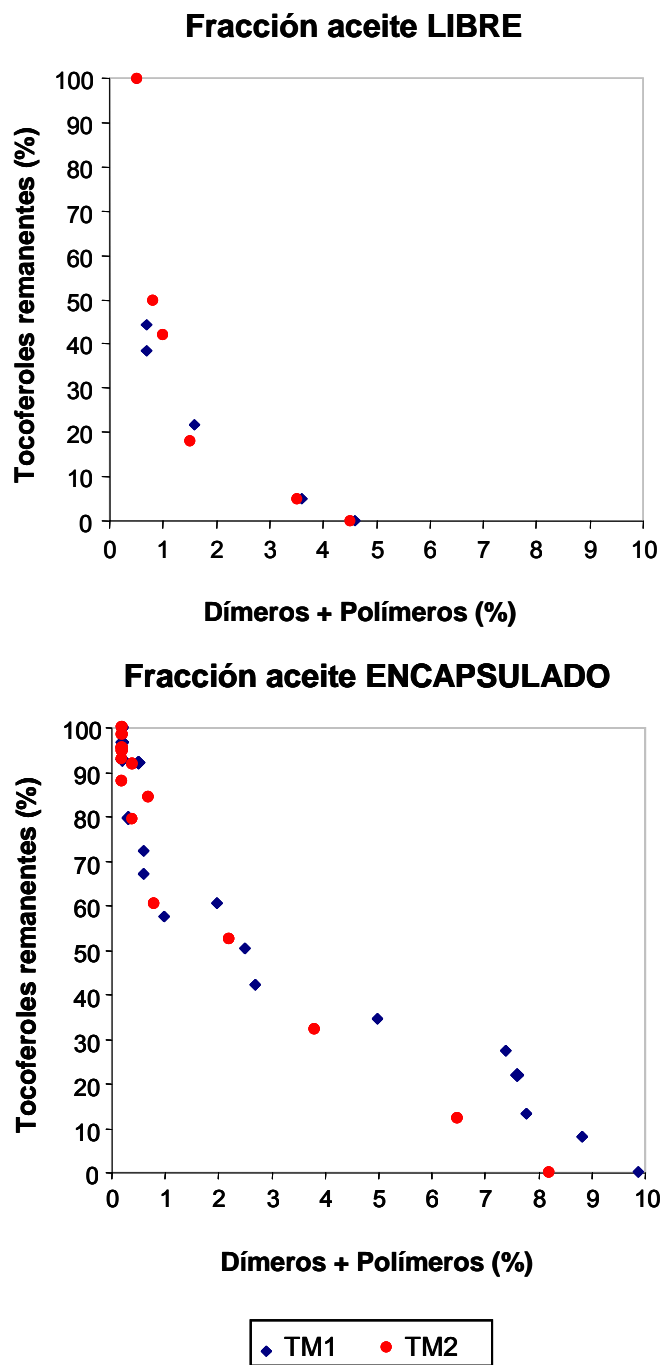


Figura 4.30 - Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras TM 1 y TM 2 sometidas a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad.

De forma similar a lo ya observado en los resultados con aceites de girasol microencapsulados preparados en planta piloto (punto 4.2.), la proporción de compuestos de polimerización formados con respecto al nivel de tocoferoles durante el periodo de inducción fue mucho más elevada en la fracción encapsulada que en la fracción de aceite libre. Estos resultados se atribuyen al carácter discontinuo de la oxidación en la fracción de aceite encapsulado, es decir, a la coexistencia de gotas de aceite con diferentes estadios de oxidación (desde gotas de aceite poco oxidadas con cantidades elevadas de tocoferoles hasta gotas de aceite muy oxidadas, ya desprovistas de tocoferoles y con cantidades significativas de polímeros). Sin embargo, es interesante destacar que la proporción de polímeros con respecto al nivel de tocoferoles remanentes fue superior en las fracciones libres de TM 1 y TM 2 que en cualquiera de las muestras de aceite de girasol microencapsulado, y especialmente si se compara con la muestra de matriz láctea preparada por atomización LA70 (**Figura 4.14**), debido, como ya ha sido comentado, a la formación de cantidades significativas de polímeros con anterioridad al final del periodo de inducción, es decir, cuando se produce la pérdida total de tocoferoles, que se observa en el aceite rico en CLA.

Sólo se han publicado hasta el momento cuatro trabajos sobre la oxidación de ácido linoleico conjugado microencapsulado (Kim *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2004, 2006; Lee *et al.*, 2009). Estos trabajos utilizaron el ácido graso libre y tuvieron como objetivo primordial estudiar la influencia de distintas matrices y condiciones de preparación en la eficacia de encapsulación del CLA. Cuando se evaluó la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento, no se realizó la extracción diferenciada de la fracción libre y encapsulada para determinar su oxidación separadamente a lo largo de todo el experimento. Los métodos de evaluación más empleados fueron el índice de peróxidos y la pérdida de sustrato. Aunque los autores no lo comenten en la discusión de los resultados, los valores del índice de peróxidos obtenidos fueron normalmente muy bajos (Jiménez *et al.*, 2004, 2006) y, por tanto, indicativos de que la formación de hidroperóxidos es minoritaria y no representativa del estado de oxidación. Por ejemplo, Jiménez y colaboradores almacenaron muestras de ácido linoleico microencapsulado en matriz de proteínas de suero de leche a 35 y 45 °C, y encontraron que muestras con pérdidas de sustrato superiores al 50% presentaban valores del índice de peróxidos inferiores a 5 meq O₂/kg (Jiménez *et al.*, 2004). En cuanto a la cuantificación de la pérdida de sustrato mediante cromatografía de gases, se trata de una medida generalmente muy utilizada para evaluar la oxidación en compuestos modelo y aceites microencapsulados ((Ponginebbi *et al.*, 2000; Hardas *et al.*, 2000, 2002; Minemoto *et al.*, 1997, 1999, 2002a, b; Fang *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2006). La pérdida de sustrato es una medida indirecta del grado de oxidación porque se cuantifican, mediante patrón interno, los ésteres metílicos no oxidados que eluyen en la columna de cromatografía de gases, y por diferencia se calculan los compuestos oxidados.

Con objeto de evaluar la utilidad de la pérdida de sustrato, se aplicó esta determinación a la fracción de aceite encapsulado de la muestra TM 1. Se obtuvieron los ésteres metílicos y se analizaron mediante cromatografía de gases, utilizando C19:0 como patrón interno (apartado 3.6.3.). En la **Tabla 4.28** se recogen los resultados obtenidos expresados en pérdida porcentual de la suma de los isómeros de CLA, junto con los valores (porcentajes) obtenidos para los compuestos de polimerización formados. Mientras que la formación de compuestos de polimerización fue consistente desde el principio de la oxidación y experimentó un aumento significativo a los 48 días (2 %), en la medida de pérdida de sustrato se observaron fluctuaciones importantes y sólo a los 64 días, cuando los compuestos de polimerización alcanzaron el 13,3 % de la muestra, se detectó un cambio significativo. Por tanto, la pérdida de sustrato sólo fue detectada en una fase de oxidación muy avanzada. Además, los duplicados de las muestras mostraron coeficientes de variación mucho más elevados para la determinación de la pérdida de sustrato que para la determinación de los compuestos de polimerización.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en nuestro laboratorio en sistemas modelo de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) que fueron oxidados tanto a temperatura ambiente como moderada. Sin separación previa, sin necesidad de adicionar un patrón interno y mediante el análisis directo por HPSEC fue posible cuantificar los FAME no oxidados, los FAME monómeros oxidados, que incluyen los hidroperóxidos, los FAME dímeros y polímeros. Los resultados mostraron elevada repetitividad y sensibilidad, ventajas sustanciales frente a la determinación de pérdida de sustrato mediante CG. Incluso utilizando compuestos modelo puros, pudo observarse que la sensibilidad de la medida de la pérdida de sustrato fue muy inferior, ya que sólo se detectaron cambios cuando el nivel de compuestos de polimerización alcanzó el 5%, es decir, cuando el nivel de oxidación era ya elevado (Márquez-Ruiz *et al.*, 2007).

Tabla 4.28 - Evolución de la pérdida de sustrato y de la formación de compuestos de polimerización en la fracción de aceite encapsulado de las muestras TM1.

| Días | Pérdida de sustrato (%) | | Dímeros + Polímeros (%) | |
|------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | Media | CV (%) | Media | CV (%) |
| 0 | 0,0 | 0,00 | 0,2 | 6,35 |
| 4 | 1,1 | 62,00 | 0,2 | 5,42 |
| 7 | 0,8 | 54,23 | 0,2 | 7,10 |
| 14 | 3,2 | 47,23 | 0,5 | 4,56 |
| 27 | 1,2 | 205,46 | 0,3 | 5,98 |
| 35 | 0,4 | 32,13 | 0,6 | 3,26 |
| 42 | 0,6 | 148,52 | 0,6 | 4,02 |
| 48 | 4,3 | 33,54 | 2,0 | 3,74 |
| 50 | 4,7 | 22,09 | 1,0 | 3,52 |
| 55 | 3,8 | 29,56 | 2,7 | 4,03 |
| 57 | 1,8 | 165,42 | 2,5 | 3,85 |
| 62 | 3,9 | 59,36 | 5,0 | 2,25 |
| 64 | 13,3 | 12,22 | 7,4 | 2,87 |
| 69 | 13,5 | 10,48 | 7,6 | 2,5 |
| 71 | 13,9 | 11,22 | 7,8 | 0,99 |
| 77 | 13,7 | 9,86 | 8,9 | 0,89 |
| 80 | 29,3 | 0,61 | 9,9 | 1,10 |

Los resultados expresan la media y el coeficiente de variación de 3 muestras.

La única diferencia observada entre el comportamiento oxidativo de TM 1 y TM 2 es la velocidad de oxidación de la fracción encapsulada, superior en la TM 1. Así por ejemplo, a los 80 días de almacenamiento, la muestra TM 1 carecía de tocoferoles y presentaba un nivel del 10 % de polímeros, mientras que la muestra TM 2 a los 77 días mantenía aproximadamente la mitad de los tocoferoles iniciales y contenía 2,2 % de polímeros. La mayor inestabilidad oxidativa de TM 1 frente a TM 2 es difícil de explicar dado que ninguna característica fisicoquímica ni parámetro oxidativo evaluados en las muestras iniciales TM 1 y TM 2 parece justificarla, e indica la influencia de otras variables implicadas en la elaboración de las muestras.

4.3.1.3. Comportamiento oxidativo del aceite Tonalin® microencapsulado exento de aceite libre

No se han encontrado referencias previas sobre el efecto de la fracción de aceite libre en la oxidación de la fracción de aceite encapsulado y consideramos que el aceite Tonalin® microencapsulado proporcionaba un excelente sustrato para evaluar dicho efecto. Se seleccionó la muestra más estable, TM 2. Para eliminar el aceite libre, la muestra fue lavada con hexano, tal y como se detalla en el punto 3.3.3.1 del apartado de Materiales y Métodos. Las condiciones de almacenamiento fueron las mismas que las utilizadas para TM 1 y TM 2.

Las principales características fisicoquímicas de la muestra TM 2 sin aceite libre se recogen en la **Tabla 4.29**. Con fines comparativos, también se han incluido los resultados de la correspondiente muestra original. La **Figura 4.31** muestra las curvas de frecuencia de tamaños de glóbulos de aceite (A) y las curvas DSC (B) de la muestra TM2 sin aceite libre.

Tabla 4.29 - Características fisicoquímicas de las muestras TM 2 y TM 2 sin aceite libre.

| | TM 2 | TM 2 sin aceite libre |
|--|--------------------|-----------------------|
| Parámetros de tamaño de glóbulos: | | |
| $d_{(v, 0,5)} (\mu\text{m})$ | $0,74 \pm 0,02$ | $0,70 \pm 0,05$ |
| $d_{(v, 0,9)} - d_{(v, 0,1)} (\mu\text{m})$ | $9,31 \pm 0,87^a$ | $7,52 \pm 0,24^b$ |
| $D [3,2] (\mu\text{m})$ | $0,58 \pm 0,05$ | $0,55 \pm 0,01$ |
| $ASE (\mu\text{m}^{-1})$ | $10,34 \pm 0,30$ | $10,91 \pm 0,15$ |
| Actividad de agua, a_w | $0,18 \pm 0,002$ | $0,20 \pm 0,003$ |
| Temperatura de transición vítrea, T_g (°C) | $75,38 \pm 0,62^a$ | $32,34 \pm 0,75^b$ |
| Parámetros de color: | | |
| $L^*(D65)$ | $94,39 \pm 0,11$ | $94,41 \pm 0,07$ |
| $a^*(D65)$ | $-1,72 \pm 0,04$ | $-2,15 \pm 0,17$ |
| $b^*(D65)$ | $13,32 \pm 0,15$ | $12,60 \pm 0,14$ |
| Solubilidad, t (s) | $230 \pm 0,6^a$ | $245 \pm 0,7^b$ |
| pH | $6,7 \pm 0,05$ | $6,5 \pm 0,05$ |

Los resultados expresan la media \pm la desviación estándar de la media de 3 muestras. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como puede observarse, la eliminación del aceite libre tuvo como resultado una menor dispersión de tamaños de gota y dio lugar a una enorme disminución de la Tg. Esto indica que se produjeron importantes cambios estructurales debido al procedimiento de lavado con hexano y posterior secado de las muestras que, sin embargo, no afectaron al tamaño promedio de las gotas de aceite. La solubilidad sólo fue ligeramente inferior en la muestra sin aceite libre, aun cuando según algunos autores la velocidad de disolución aumentaría al disminuir la cantidad de aceite libre debido a que el aceite en la superficie de la partícula dificulta el contacto entre la matriz y el agua (McNamee *et al.*, 1998).

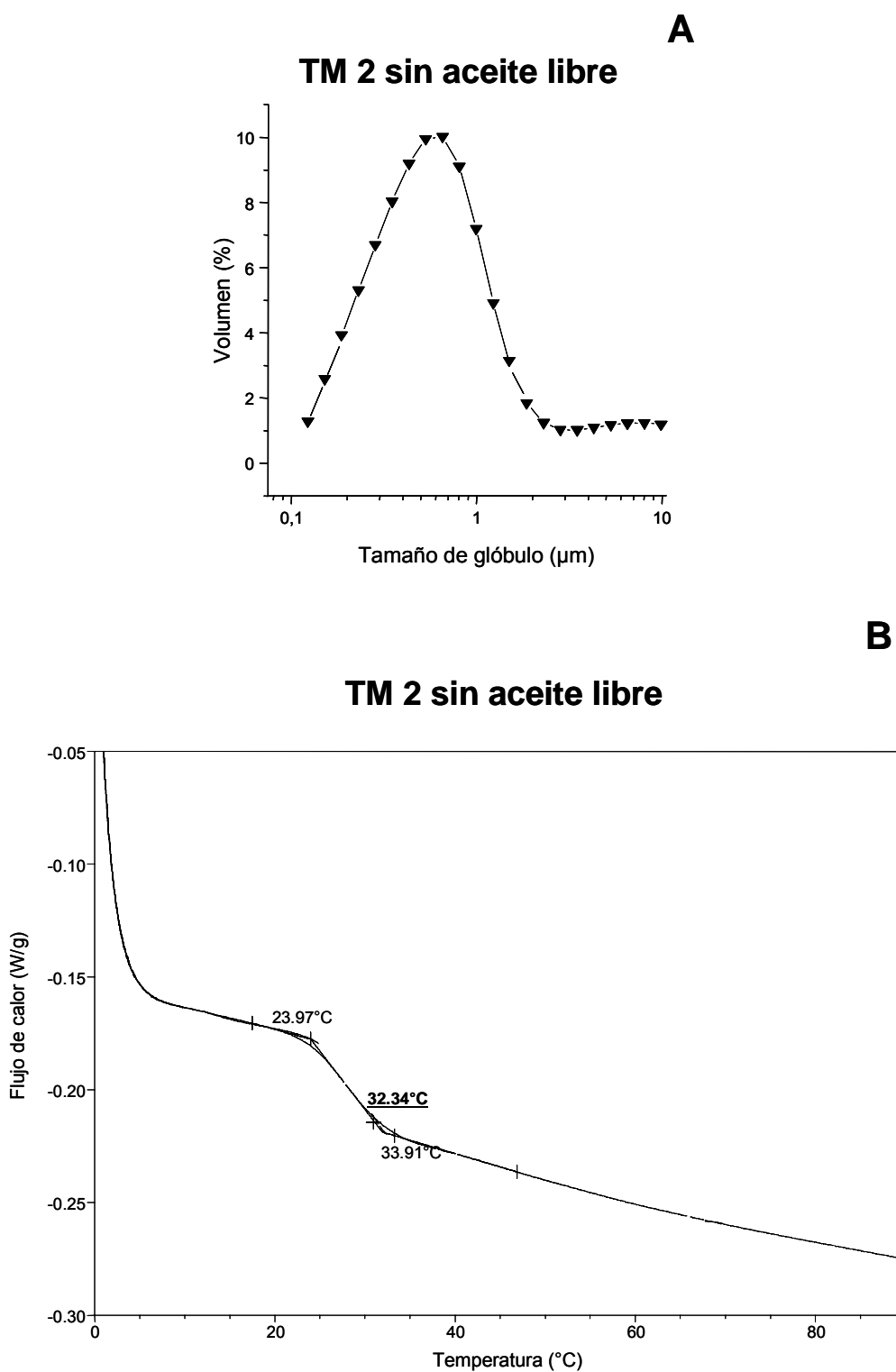


Figura 4.31 - Distribución de tamaño de glóbulo (A) y curva DSC (B) de la muestra TM 2 sin aceite libre.

La **Tabla 4.30** y la **Figura 4.32** recogen los resultados correspondientes a la evolución de la oxidación del aceite extraído de la muestra TM2 sin aceite libre.

Tabla 4.30 - Evolución de la oxidación de la muestra de aceite Tonalin® microencapsulado ..
TM 2 sin aceite libre.

| TM 2 sin aceite libre | | |
|-----------------------|----------------------|------------|
| Aceite encapsulado | | |
| Tiempo (días) | Tocoferol (mg/kg) | D+P (%) |
| 0 | 652 | 0,2 |
| 7 | 635 | 0,2 |
| 14 | 638 | 0,2 |
| 21 | 646 | 0,4 |
| 28 | 634 | 0,2 |
| 35 | 664 | 0,4 |
| 42 | 637 | 0,2 |
| 49 | 627 | 0,2 |
| 56 | 555 | 0,2 |
| 63 | 448 | 0,3 |
| 70 | 473 | 0,9 |
| 80 | 438 | 2,6 |
| 94 | 392 | 4,0 |
| 115 | 339 | 6,1 |
| 125 | 267 | 8,5 |
| 150 | 0 | 13,1 |

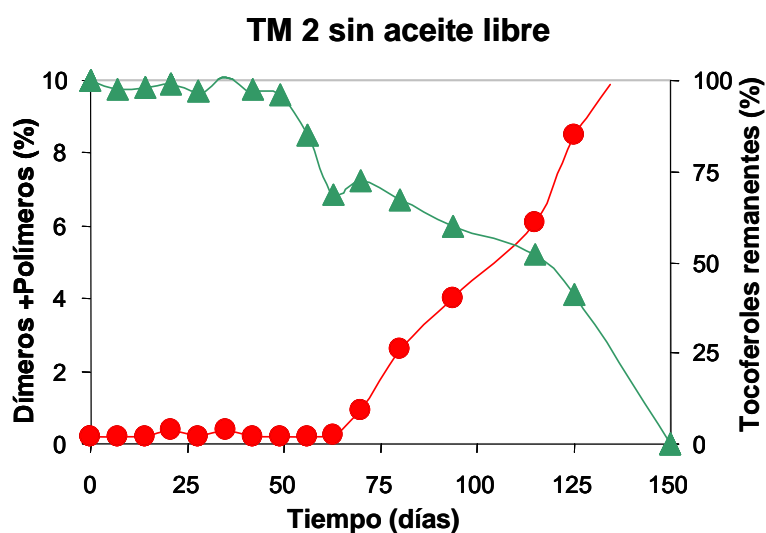


Figura 4.32 - Evolución de la oxidación en el aceite (encapsulado) extraído de TM 2 sin aceite libre almacenado a 30 °C, HR de 0 % y oscuridad.
Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

La preparación de la muestra TM 2 sin aceite libre resultó en una ligera pérdida de tocoferoles (**Tabla 4.30**), si se compara con la muestra inicial de aceite encapsulado de TM 2 (**Tabla 4.27**). En cuanto a la evolución de la oxidación, se observó que la formación de polímeros (**Figura 4.32**) presentó un perfil similar al del aceite encapsulado de la muestra TM2 inicial (**Figura 4.28**), mientras que la pérdida de tocoferoles fue relativamente más lenta a partir de los 64 días de almacenamiento. Estas diferencias podrían ser atribuidas a una fracción de aceite que tras la etapa de lavado con hexano quedara más protegida por la matriz de encapsulación como consecuencia de cambios en su estructura que dieran lugar a una menor permeabilidad a la difusión de oxígeno. Por tanto, los resultados no son concluyentes para indicar que la oxidación de la fracción de aceite encapsulado no se ve afectada por la fracción de aceite libre.

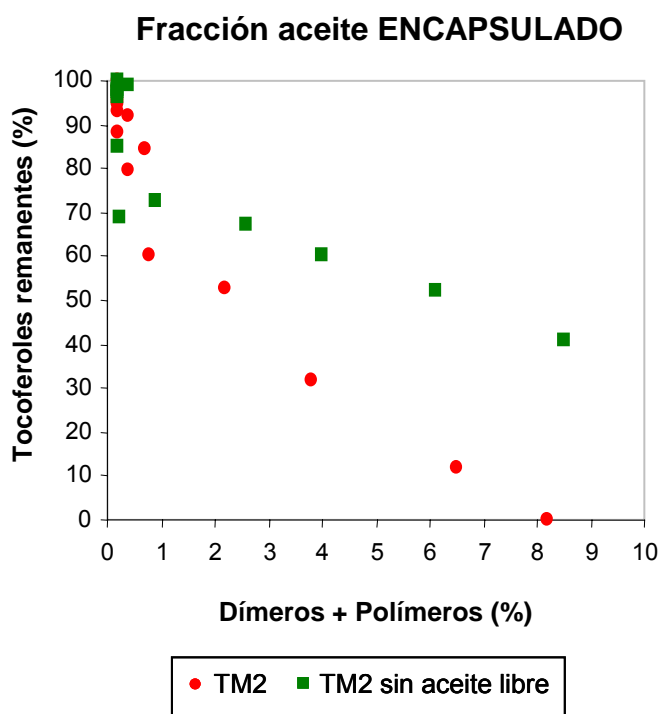


Figura 4.33 - Evolución de la relación entre tocoferoles remanentes y cantidades de compuestos de polimerización en las fracciones de aceite encapsulado extraído de muestras TM 2 y del aceite (encapsulado) de la muestra TM 2 sin aceite libre almacenadas a 30 °C, HR de 0% y oscuridad.

4.3.2.- Fórmulas infantiles

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 1.1.1.6.) las fórmulas infantiles en polvo, son *per se* aceites microencapsulados ya que se preparan normalmente a partir de leche de vaca que ha sido desnatada total o parcialmente y diferentes aceites vegetales, además de otros hidratos de carbono y proteínas y oligoelementos; y posteriormente se realiza su secado para obtener el producto en polvo, siendo la atomización el método más empleado (Joeckel y Phillips, 2009; Thompson y Kharb, 2007).

Este apartado incluye los estudios de oxidación realizados en dos fórmulas infantiles, de inicio (FI 1) y de continuación (FI 2). La formulación de ambas incluye la misma mezcla de aceites vegetales y, mientras que la FI 1 está basada en una matriz con componentes lácteos, la FI 2 incluye maltodextrina como hidrato de carbono mayoritario, además de componentes lácteos en menor proporción. Por tanto, FI 1 y FI 2 presentan cierta similitud con las muestras de aceite de girasol microencapsulado preparadas por atomización en planta piloto, LA70 y MA70, aunque la composición de las fórmulas infantiles es mucho más compleja y las condiciones específicas de preparación de las emulsiones y del proceso de atomización son diferentes.

4.3.2.1.- Composición y caracterización de las fórmulas infantiles.

Según las indicaciones del fabricante, los ingredientes de las fórmulas FI 1 y FI 2, en orden de cantidades decrecientes, fueron los siguientes:

FI 1: Suero lácteo desmineralizado, aceites vegetales, leche descremada, lactosa, lecitina, aminoácidos (arginina, histidina y triptófano), vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, B1, B6, A, B2, ácido fólico, K, biotina, D3 y B12), colina, taurina, inositol y carnitina.

FI 2: Maltodextrinas, aceites vegetales, leche descremada, suero lácteo desmineralizado, minerales, lactosa, lecitina, vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, B1, B6, A, B2, ácido fólico, K, biotina, D3 y B12), colina, taurina, inositol y carnitina.

La composición nutricional de ambas fórmulas, suministrada por el fabricante, se recoge en la **Tabla 4.31**.

Tabla 4.31 - Composición nutricional de las fórmulas infantiles estudiadas.

| | FI 1 | FI 2 |
|-------------------------------|------|------|
| Proteínas (g/100 g) | 10,8 | 12,0 |
| Hidratos de carbono (g/100 g) | 53,8 | 56,3 |
| Grasas (g/100 g): | 29,0 | 25,0 |
| - Ácido linoleico | 4,51 | 3,89 |
| - Ácido linolénico | 0,43 | 0,37 |

Las condiciones de preparación de las fórmulas infantiles consistieron en primer lugar en la obtención de leche de vaca descremada, y su posterior pasteurización (72°C/15s) y concentración (en evaporador de película descendente a 85°C, 66°C y 58°C durante 5 min). Después se adicionaron proteínas de suero de la leche pasteurizadas (72°C/15s), una mezcla de aceites vegetales, lactosa, maltodextrinas en el caso de FI 2 y minerales. Tras esterilización mediante HTST (100°C/22s), se adicionó el resto de los ingredientes y se realizó el secado mediante atomización (temperatura de entrada: 175°C-185°C; temperatura de salida: 90°C-94°C).

En la **Tabla 4.32** se muestran las principales características fisicoquímicas de ambas fórmulas. Las **Figuras 4.34 y 4.35** recogen las curvas de frecuencia de tamaños de glóbulos de aceite (A) y las curvas DSC (B) de las muestras FI 1 y FI 2, respectivamente. En las curvas DSC se han incluido también las resultantes del lavado de las muestras con hexano, es decir, muestras sin aceite libre.

La fórmula infantil FI 1, con mayor contenido de lípidos totales que la FI 2, mostró menor eficacia de encapsulación así como significativamente menores tamaños de glóbulo medio y Tg, aunque las diferencias no fueron tan marcadas como podría esperarse de las grandes diferencias entre ambas fórmulas en su compleja composición. De hecho, el resto de los parámetros de tamaño de glóbulo, como la dispersión de gotas, el diámetro de Sauter (D[3,2]), o el área de superficie específica de las gotas de aceite (ASE), fueron similares. Cabe destacar que los valores de dispersión de gotas en FI 1 y FI 2 fueron elevados y muy superiores a los encontrados en las muestras TM 1 y TM 2 (alrededor de 10 µm) preparadas también industrialmente mediante atomización, probablemente debido a diferencias en la presión aplicada en la preparación de las emulsiones. En las muestras preparadas en planta piloto, sólo se encontraron valores de dispersión tan elevados en aquellas con matriz de maltodextrina.

Tabla 4.32 - Características fisicoquímicas de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2.

| | FI 1 | FI 2 |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Distribución lipídica: | | |
| Aceite Total (g/100 g) | 28,22 ± 0,89 ^a | 24,37 ± 1,77 ^b |
| Aceite Libre (g/100 g) | 3,27 ± 0,22 ^a | 1,95 ± 0,08 ^b |
| Eficacia de Encapsulación (%) | 88,4 ± 1,20 ^a | 92,0 ± 0,25 ^b |
| Parámetros de tamaño de glóbulos: (lente 45 mm) | | |
| d _(v, 0,5) (μm) | 0,93 ± 0,01 ^a | 1,20 ± 0,02 ^b |
| d _(v, 0,9) - d _(v, 0,1) (μm) | 41,28 ± 9,43 | 33,45 ± 2,87 |
| D [3,2] (μm) | 0,68 ± 0,01 | 0,76 ± 0,01 |
| ASE (μm ⁻¹) | 8,89 ± 0,18 | 7,89 ± 0,10 |
| Actividad de agua, a_w | 0,13 ± 0,004 | 0,16 ± 0,005 |
| Temperatura de transición vítrea, T_g (°C) | 67,53 ± 0,30 ^a | 63,86 ± 0,49 ^b |
| Parámetros de densidad: | | |
| A (kg/m ³) | 391 ± 2,6 | 385 ± 3,1 |
| P (kg/m ³) | 532 ± 4,9 | 501 ± 7 |
| Aire intersticial (mm ³ /g) | 679 ± 22 | 599 ± 28 |
| Compresibilidad (%) | 26,56 ± 2,1 | 23,08 ± 2,7 |
| Solubilidad, t (s) | 16 ± 0,7 | 20 ± 0,6 |
| pH | 7,15 ± 0,05 | 7,09 ± 0,05 |

Los resultados expresan la media ± la desviación estándar de la media de 3 muestras.
 Letras distintas en una misma fila significan diferencias significativas (p<0,05).

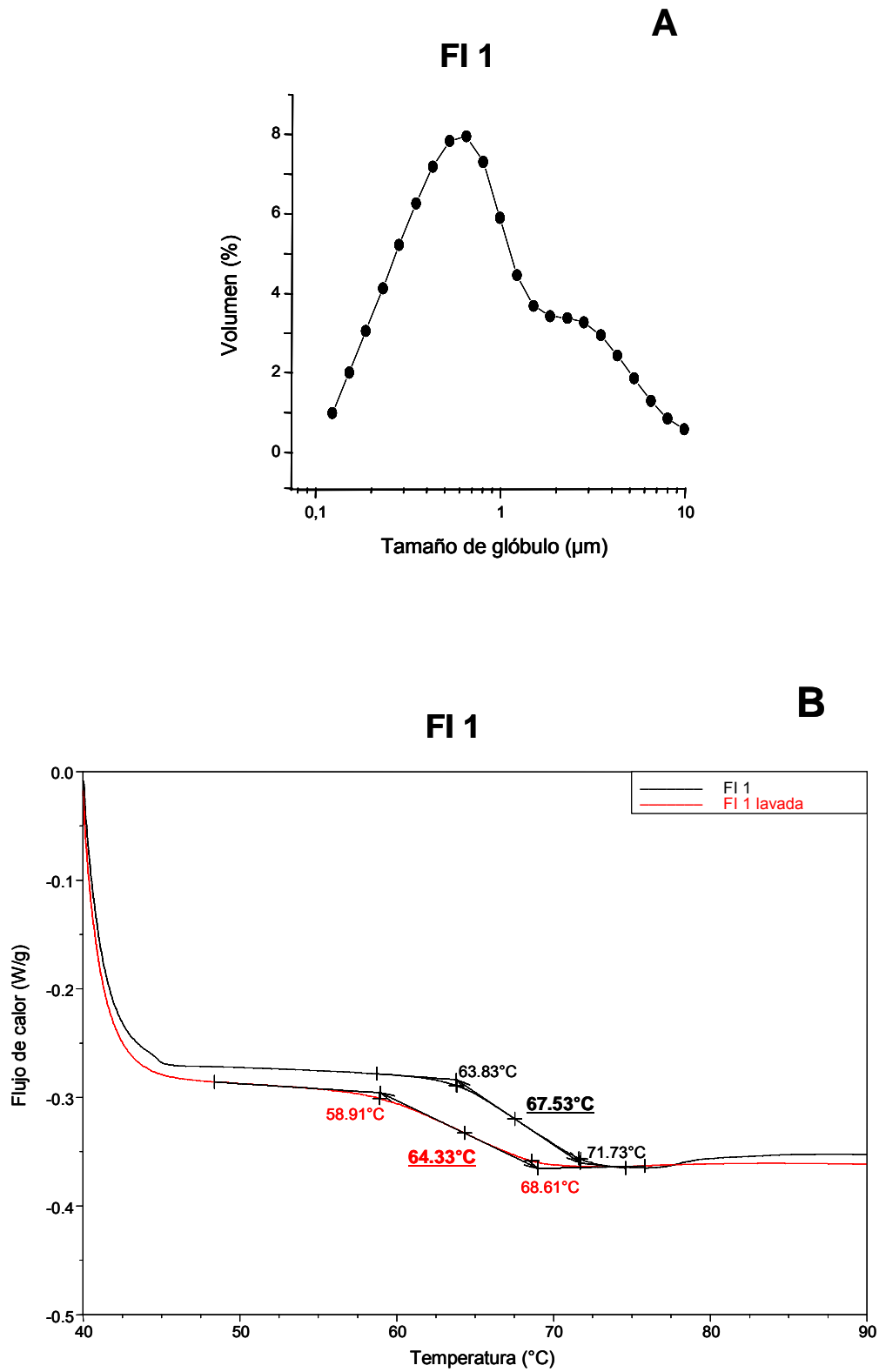


Figura 4.34 - Distribución de tamaños de glóbulos (A) y curva DSC (B) de la muestra FI 1.

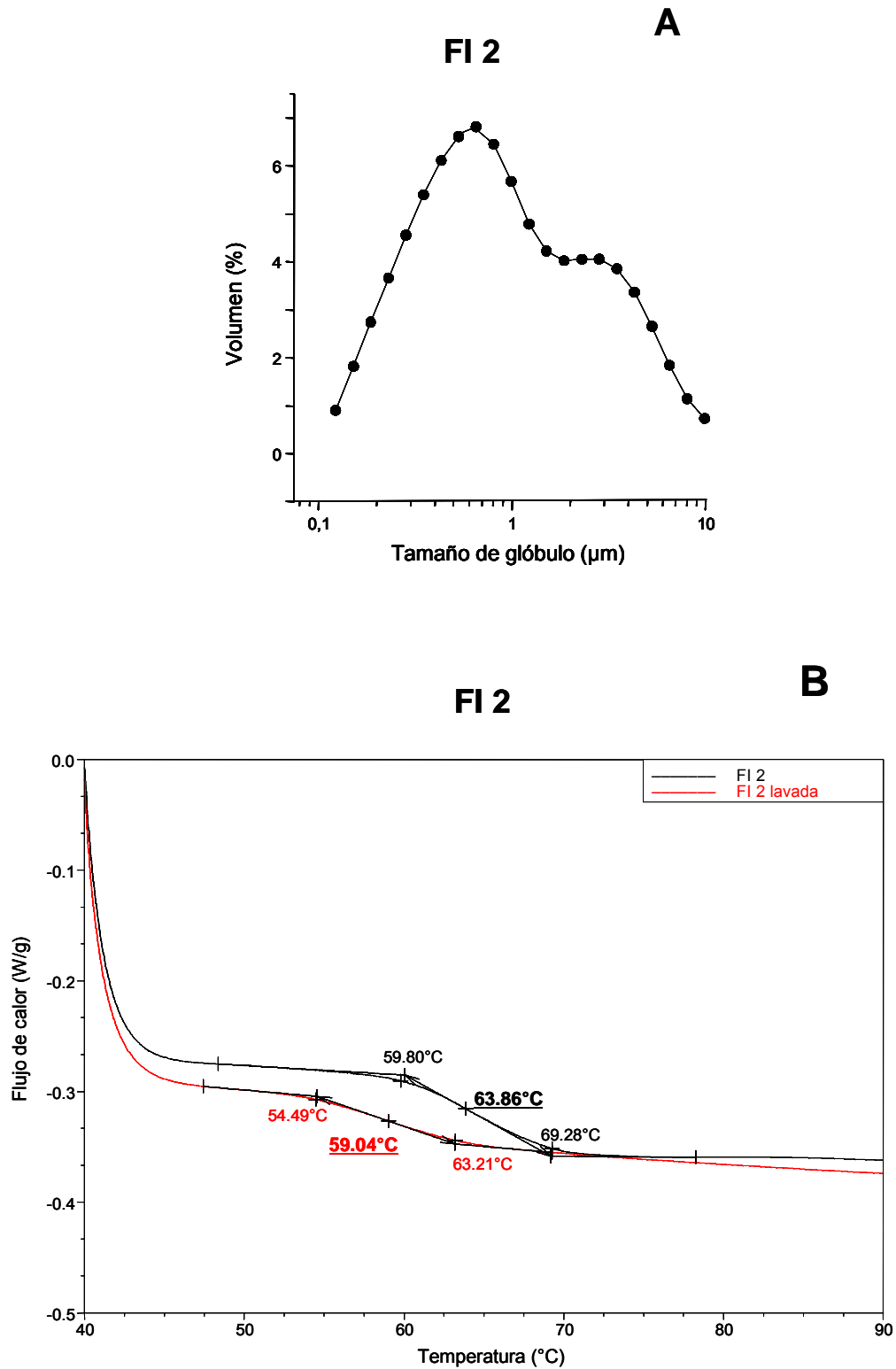


Figura 4.35 - Distribución de tamaños de glóbulos (A) y curva DSC (B) de la muestra FI 2.

Como puede observarse en las **Figuras 4.34 y 4.35**, las muestras FI 1 y FI 2 presentaron una distribución de frecuencias bimodal. La contribución de maltodextrinas en la composición de FI 2 no se vio reflejada en cambios importantes en la distribución de frecuencias.

En relación con las curvas de DSC, obtenidas también para las muestras lavadas (exentas de la fracción de aceite libre), se observó un descenso significativo de la temperatura de transición vítrea tras la extracción del aceite libre. Dicho descenso, similar en ambas muestras, fue leve (aproximadamente de 4 °C) e indica pequeños cambios estructurales tras el lavado y posterior secado. Sin embargo, en las muestras de aceite Tonalin® microencapsulado TM 2 (apartado 4.3.1.3.) el lavado produjo una enorme disminución de la Tg, de aproximadamente 43 °C.

La **Tabla 4.33** muestra las principales características iniciales de las fracciones de aceite extraídas de las muestras FI 1 y FI 2.

Según indicaciones del fabricante, se utilizó la misma mezcla de aceites en la elaboración de ambas fórmulas, FI 1 y FI 2, y así se reflejó en los resultados obtenidos en la composición de ácidos grasos. Además, tanto el contenido de tocoferoles como los parámetros de oxidación e hidrólisis fueron similares en FI 1 y FI 2. En la composición de ácidos grasos, destaca el ácido oleico como el mayoritario, seguido de los ácidos linoleico y palmítico, en similar proporción, y el ácido láurico. En relación con las fracciones libre y encapsulada, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de oxidación a excepción del IP, superior en las fracciones superficiales. Además, se observa que los valores de tocoferoles son ligeramente inferiores en las fracciones superficiales que en las encapsuladas.

Tabla 4.33 - Caracterización de los aceites extraídos de las muestras iniciales de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2.

| | FI 1 | | FI 2 | |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Libre | Encapsulado | Libre | Encapsulado |
| Composición en ácidos grasos (%): | | | | |
| C6:0 | 0,2 ± 0,01 | 0,2 ± 0,02 | 0,2 ± 0,01 | 0,2 ± 0,01 |
| C8:0 | 1,8 ± 0,01 | 1,8 ± 0,03 | 1,7 ± 0,01 | 1,7 ± 0,01 |
| C10:0 | 1,3 ± 0,01 | 1,3 ± 0,01 | 1,3 ± 0,02 | 1,3 ± 0,03 |
| C12:0 | 10,2 ± 0,12 | 10,3 ± 0,21 | 9,6 ± 0,19 | 10,1 ± 0,14 |
| C14:0 | 4,0 ± 0,05 | 4,1 ± 0,03 | 4,1 ± 0,08 | 4,2 ± 0,02 |
| C16:0 | 16,8 ± 0,24 | 16,6 ± 0,18 | 15,7 ± 0,25 | 15,0 ± 0,21 |
| C18:0 | 3,2 ± 0,16 | 3,1 ± 0,01 | 3,5 ± 0,18 | 2,9 ± 0,32 |
| C18:1 | 41,2 ± 0,03 | 42,2 ± 0,05 | 43,9 ± 0,02 | 44,2 ± 0,05 |
| C18:2 | 17,8 ± 0,58 | 18,2 ± 0,67 | 17,4 ± 0,56 | 18,0 ± 0,74 |
| C18:3 | 1,5 ± 0,04 | 1,4 ± 0,05 | 1,4 ± 0,05 | 1,4 ± 0,06 |
| C20:0 | 0,3 ± 0,01 | 0,2 ± 0,01 | 0,2 ± 0,00 | 0,2 ± 0,01 |
| C20:1 | 0,3 ± 0,01 | 0,2 ± 0,01 | 0,4 ± 0,01 | 0,4 ± 0,01 |
| C20:4 | 0,3 ± 0,02 | 0,3 ± 0,01 | 0,3 ± 0,02 | 0,3 ± 0,01 |
| C20:5 | 0,1 ± 0,01 | 0,1 ± 0,01 | 0,1 ± 0,01 | 0,1 ± 0,01 |
| Compuestos Polares (%): | 4,6 | 4,7 | 4,8 | 5,1 |
| TGMox (%) | 1,1 ± 0,02 | 1,2 ± 0,08 | 1,3 ± 0,12 | 1,5 ± 0,10 |
| Pol + Dim (%) | 0,3 ± 0,04 | 0,3 ± 0,10 | 0,4 ± 0,08 | 0,3 ± 0,11 |
| DG | 2,6 ± 0,10 | 2,7 ± 0,08 | 2,5 ± 0,12 | 2,7 ± 0,06 |
| AG | 0,6 ± 0,06 | 0,5 ± 0,01 | 0,7 ± 0,02 | 0,6 ± 0,02 |
| Índice de peróxidos (meq O₂/kg) | 7,9 ± 0,50 ^a | 3,0 ± 0,33 ^b | 9,3 ± 0,70 ^c | 3,2 ± 0,12 ^b |
| Tocoferoles (mg/kg) | 364 ± 15 | 402 ± 17 | 379 ± 20 | 392 ± 18 |
| Estabilidad oxidativa (h) | 18,6 ± 0,70 | 17,0 ± 0,45 | 17,8 ± 0,95 | 16,1 ± 1,01 |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de la media de 3 muestras.

Pol+Dim: Polímeros y dímeros de triglicéridos; TGMox: Triglicéridos monómeros oxidados; DG: Diglicéridos; AG: Ácidos grasos libres; IP: índice de peróxidos.

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de las fracciones libre y encapsulada (p<0,05).

4.3.2.2.- Comportamiento oxidativo de las fórmulas infantiles

Las fórmulas infantiles fueron almacenadas en placas Petri (10 g por placa) en estufa a 30 °C en condiciones de sequedad y oscuridad durante 4 meses. Además, se almacenaron muestras en sus envases originales a 25 °C en una cámara termostatzada

durante 30 meses. La evaluación de la oxidación se llevó a cabo con los mismos métodos empleados en los sistemas modelos estudiados en esta Tesis, es decir, la medida del índice de peróxidos, la determinación directa de los dímeros y polímeros de triglicéridos mediante HPSEC y la cuantificación de los tocoferoles mediante HPLC.

Las **Tablas 4.34 y 4.35** recogen los resultados correspondientes a la evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado de las muestras FI 1 y FI 2, respectivamente, en estufa a 30 °C. Así mismo, las **Figuras 4.36 y 4.37** ilustran la relación entre los parámetros evaluados.

Se observa claramente que la velocidad de oxidación de las fracciones libres fue mucho más elevada que la de sus correspondientes fracciones encapsuladas. A los 4 meses, las fracciones libres estaban exentas de antioxidantes y con elevado grado de oxidación mientras que las fracciones encapsuladas mantenían un porcentaje elevado de tocoferoles (más del 60%) e índices de peróxidos inferiores a 100 meq/kg.

Con relación a la evolución oxidativa de las fracciones libres, la aparición de rancidez y todos los parámetros analíticos evaluados indican claramente que FI 1 fue más estable que FI 2:

- a) El olor a rancio fue detectado a los 90 días en las muestras FI 2 y un mes más tarde en las FI 1.
- b) FI 2 alcanzó un índice de peróxidos de 100 meq/kg entre 7 y 11 días mientras que esto ocurrió en FI 1 entre 15 y 30 días.
- c) Los tocoferoles se agotaron a los 90 días en FI 2, frente a 120 días en FI 1.

Tabla 4.34 - Evolución de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 1.

| FI 1 | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 7,9 | 364 | 0,3 | 0 | 3,0 | 402 | 0,3 |
| 3 | 21 | 361 | 0,3 | 3 | 3,2 | 400 | 0,4 |
| 7 | 32 | 358 | 0,3 | 7 | 4,3 | 398 | 0,6 |
| 11 | 54 | 351 | 0,3 | 11 | 6,0 | 399 | 0,7 |
| 15 | 82 | 342 | 0,5 | 15 | 7,1 | 395 | 0,7 |
| 30 | 125 | 332 | 0,7 | 30 | 8,5 | 388 | 0,8 |
| 45 | 145 | 328 | 0,7 | 45 | 13 | 384 | 0,7 |
| 60 | 150 | 332 | 0,8 | 60 | 17 | 379 | 0,7 |
| 75 | 170 | 262 | 0,7 | 75 | 20 | 346 | 0,7 |
| 90 | 176 | 158 | 0,8 | 90 | 22 | 333 | 0,8 |
| 105 | 200 | 109 | 1,0 | 105 | 38 | 322 | 0,8 |
| 120 | 227 | 0 | 2,7 | 120 | 49 | 293 | 0,8 |

Tabla 4.35 - Evolución de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 2.

| FI 2 | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------|
| Fracción de aceite libre | | | | Fracción de aceite encapsulado | | | |
| Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) | Tiempo (días) | IP (meq/kg) | Tocoferol (mg/kg) | Pol (%) |
| 0 | 9,3 | 379 | 0,4 | 0 | 3,2 | 393 | 0,3 |
| 3 | 53 | 365 | 0,4 | 3 | 3,1 | 392 | 0,5 |
| 7 | 85 | 352 | 0,7 | 7 | 5,3 | 390 | 0,5 |
| 11 | 130 | 340 | 1,0 | 11 | 6,5 | 395 | 0,7 |
| 15 | 187 | 338 | 1,2 | 15 | 7,8 | 390 | 0,7 |
| 30 | 283 | 323 | 1,3 | 30 | 14 | 387 | 0,8 |
| 45 | 285 | 284 | 1,3 | 45 | 18 | 383 | 0,9 |
| 60 | 292 | 213 | 2,2 | 60 | 22 | 378 | 1,0 |
| 75 | 314 | 171 | 2,3 | 75 | 28 | 345 | 1,1 |
| 90 | 342 | 0 | 3,1 | 90 | 31 | 318 | 1,3 |
| 105 | 330 | | 5,0 | 105 | 55 | 255 | 3,2 |
| 120 | 324 | | 9,3 | 120 | 69 | 229 | 4,5 |

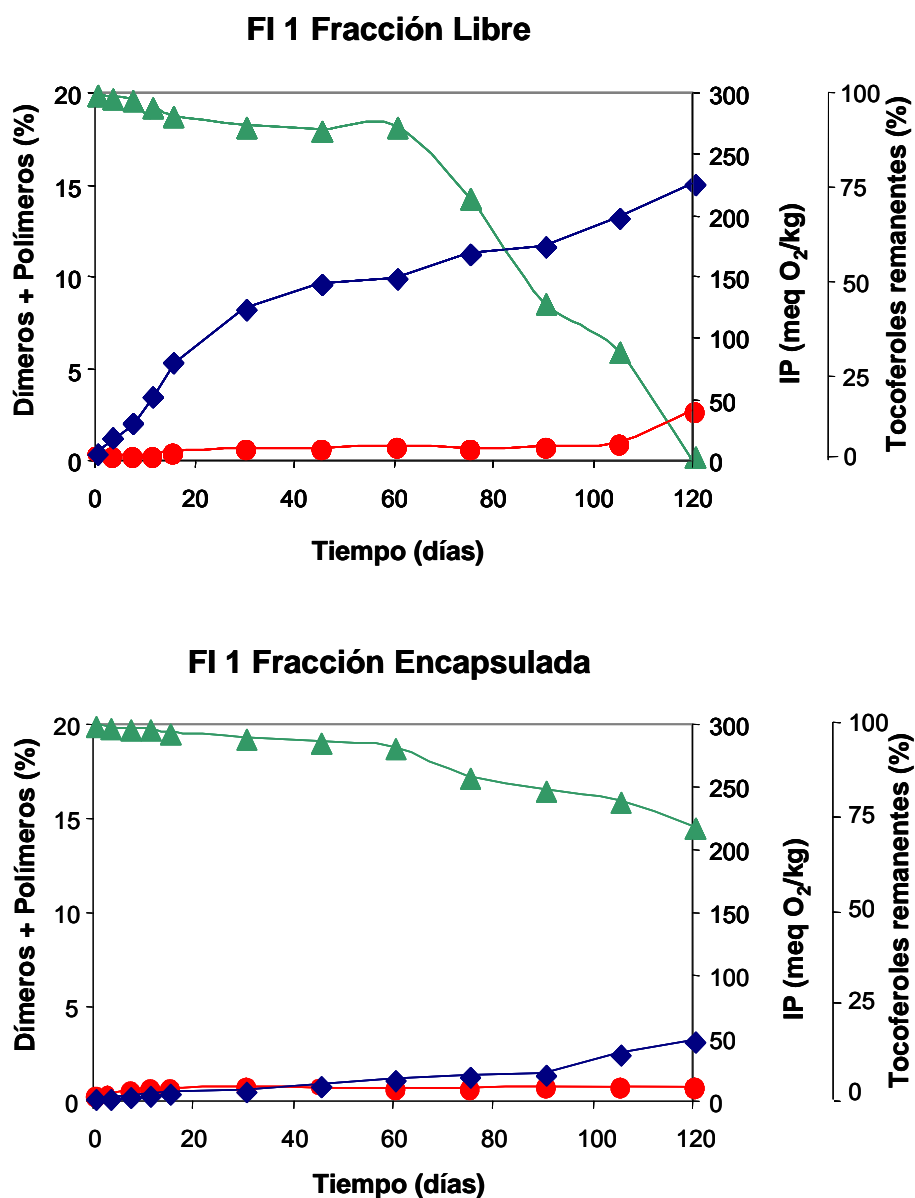


Figura 4.36 - Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras FI 1 almacenadas a 30°C, HR de 0% y oscuridad. Índice de peróxidos (IP) (♦), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

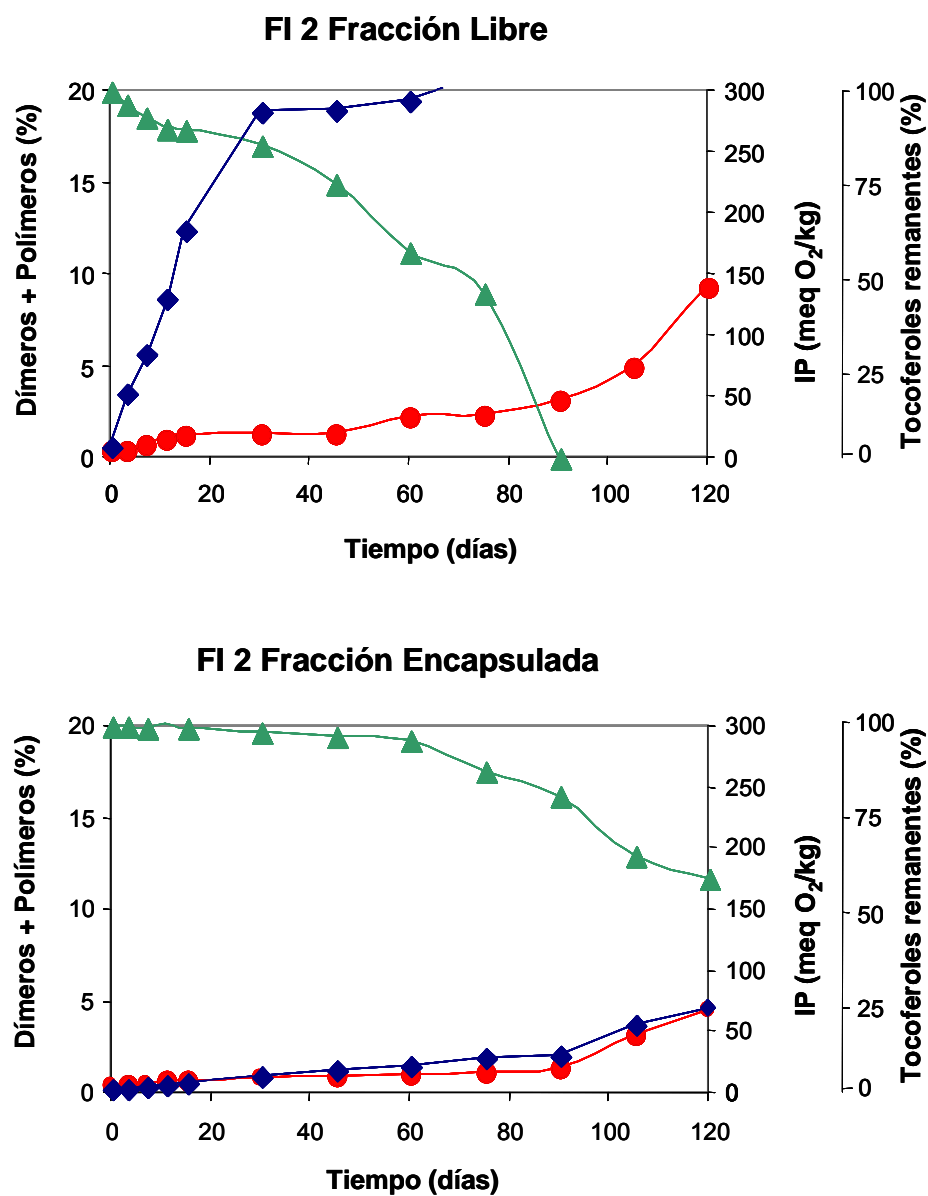


Figura 4.37 - Evolución de la oxidación en las fracciones de aceite libre y encapsulado extraídas de muestras FI 2 almacenadas a 30°C, HR de 0% y oscuridad. Índice de peróxidos (IP) (♦), Dímeros+Polímeros (●) y Tocoferoles (▲).

Las determinaciones más empleadas en la evaluación de la oxidación de las fórmulas infantiles son la determinación de compuestos volátiles, fundamentalmente el hexanal, pentanal y propanal mediante microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases (García-Llatas *et al.*, 2006; Romeu- Nadal *et al.*, 2007; Chavez-Servín *et al.*, 2008; Michalski *et al.*, 2008), y el índice de peróxidos (Manglano *et al.*, 2005; Romeu- Nadal *et al.*, 2007; Chavez-Servín *et al.*, 2009).

La extracción de los lípidos de las fórmulas infantiles se realiza normalmente mediante el método de Folch o modificaciones del mismo (Chavez-Servín *et al.*, 2008, 2009; Miquel *et al.*, 2004; Angulo *et al.*, 1998; Manglano *et al.*, 2005; De la Presa-Owens *et al.*, 1995; Lagarda *et al.*, 2003). En consecuencia, se obtiene normalmente un extracto representativo del aceite total del producto, sin diferenciación de las fracciones libre y encapsulada. Como ya se ha comentado, la aparición de la rancidez está determinada por la oxidación de la fracción de aceite libre, normalmente más susceptible a la oxidación y, por tanto, aún siendo minoritaria, su estabilidad condiciona la vida útil de estos productos. Sin embargo, no es posible detectar la oxidación de la fracción libre cuando se analiza el aceite total, constituido mayoritariamente por aceite encapsulado, y de ahí la paradoja de que muestras rancias no presenten ningún indicio de oxidación independientemente de la determinación analítica aplicada al aceite total extraído (Márquez-Ruiz *et al.*, 2003a).

La determinación del índice de peróxidos es la medida más comúnmente utilizada para evaluar la oxidación en fórmulas infantiles, no sólo en trabajos de investigación sino también en las empresas fabricantes de estos productos, ya que es un índice analítico fácilmente aplicable, que proporciona información del contenido de los compuestos de oxidación primaria, los hidroperóxidos, formados durante el periodo de inducción. Sin embargo, la determinación del índice de peróxidos es poco específica ya que se ve afectada por la presencia de otros compuestos y, por tanto, por el método de extracción y disolventes utilizados.

Con objeto de evaluar la influencia del método de extracción en la determinación del índice de peróxidos se utilizó el método de Folch para extraer el aceite encapsulado de muestras seleccionadas de las fórmulas FI 1 y FI 2 almacenadas en estufa a 30 °C, que asimismo habían sido extraídas utilizando mortero y éter dietílico (**Tablas 4.34 y 4.35**). La principal diferencia entre ambos métodos es la polaridad de los disolventes utilizados. El método de Folch (Folch *et al.*, 1951, 1957) consiste en la extracción con una mezcla de disolventes de elevada polaridad, cloroformo: metanol 2:1 ó diclorometano:metanol 2:1 en el caso de algunas modificaciones del método. Sin embargo, con el método aplicado en esta Tesis se utiliza éter dietílico tras la disrupción de la matriz mediante la acción mecánica del mortero y pistilo.

La **Tabla 4.36** muestra los resultados obtenidos. En general, el rendimiento de extracción fue muy variable en ambos métodos. Se obtuvieron menores rendimientos de extracción con mortero en las fórmulas que contienen maltodextrinas, FI 2, ya que se forma una masa gomosa que dificulta el contacto con el disolvente. Por otro lado, los resultados del IP analizado por duplicado en el mismo extracto fueron muy similares y notablemente inferiores cuando se utilizó cloroformo/metanol. Por tanto, no es de extrañar que algunos autores hayan encontrado valores de IP inesperadamente bajos en extractos de fórmulas infantiles obtenidos por el método de Folch (de la Presa-Owens, 1995; Manglano *et al.*, 2005).

Tabla 4.36 - Rendimiento de extracción e índice de peróxidos (IP) obtenidos (por duplicado) en la fracción de aceite encapsulado extraída en fórmulas infantiles mediante mortero-éter dietílico y mediante el método de Folch (cloroformo/metanol 2:1).

| Muestras | Extracción mortero-éter dietílico | | | Extracción cloroformo/metanol | | |
|-------------|-----------------------------------|-------------|------|-------------------------------|-------------|------|
| | Rendimiento extracción (%) | IP (meq/kg) | | Rendimiento extracción (%) | IP (meq/kg) | |
| FI 1 (0 d) | 56,8 | 3,1 | 2,9 | 52,3 | 0,0 | 0,0 |
| FI 1 (45 d) | 78,0 | 14,0 | 12,4 | 59,5 | 8,0 | 8,3 |
| FI 1 (120d) | 57,8 | 50,1 | 47,9 | 37,7 | 34,4 | 36,0 |
| FI 2 (0 d) | 31,7 | 3,0 | 3,4 | 75,5 | 0,0 | 0,0 |
| FI 2 (45 d) | 35,1 | 18,3 | 17,7 | 66,4 | 4,2 | 4,5 |
| FI 2 (120d) | 51,4 | 68,8 | 71,0 | 57,8 | 10,4 | 9,5 |

Las diferencias observadas en los IP de los extractos obtenidos con el método de Folch y el utilizado en esta Tesis concuerdan con las encontradas en un trabajo previo en el cual se analizaron trece formulas infantiles comerciales que se mantuvieron almacenadas a temperatura ambiente durante 18 meses (Velasco *et al.*, 2008). En dicho trabajo, se comparó la extracción con una mezcla de diclorometano: metanol (2:1) y la extracción con hexano previa disrupción de la matriz con ayuda de un mortero, y se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos empleados proporcionando el primero menores valores del IP. Estos resultados fueron atribuidos a la presencia de sustancias reductoras como la lactosa o maltodextrina, que se extrajeron conjuntamente con los lípidos, debido al medio polar proporcionado por los disolventes utilizados en el primer método. Para comprobarlo se lavaron con agua extractos obtenidos por el método 1, y se determinó de nuevo el IP. Los valores de IP aumentaron respecto al extracto no lavado confirmando que la presencia de sustancias con carácter polar y reductor interfieren en su determinación.

Por otra parte, las muestras de esta Tesis se almacenaron también en sus envases originales a 25 °C en una cámara termostatzada hasta la fecha de caducidad establecida por el fabricante, 30 meses. Concretamente, se almacenaron 5 latas de cada fórmula, FI 1 y FI 2, con contenidos de 500 g de producto y envasadas en atmósfera modificada compuesta mayoritariamente de nitrógeno (aproximadamente 80%) y CO₂. Las cantidades residuales de oxígeno estimadas fueron 3-5%.

La **Tabla 4.37** muestra los resultados obtenidos después de 30 meses.

Tabla 4.37 - Evaluación de la oxidación de las fórmulas infantiles FI 1 y FI 2 almacenadas a 25°C durante 30 meses.

| Muestra | Fracción Libre | | | Fracción Encapsulada | | |
|-------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| | IP (meq/kg) | Pol (%) | Toc (mg/kg) | IP (meq/kg) | Pol (%) | Toc (mg/kg) |
| FI 1 | | | | | | |
| 1 | 12,3 | 0,4 | 365 | 4,8 | 0,6 | 405 |
| 2 | 88,0 | 0,5 | 345 | 16,4 | 0,7 | 384 |
| 3 | 48,2 | 0,4 | 353 | 14,8 | 0,7 | 386 |
| 4 | 28,2 | 0,4 | 359 | 10,8 | 0,7 | 384 |
| 5 | 51,8 | 0,4 | 348 | 8,4 | 0,8 | 390 |
| Media ± SEM | 46 ± 13 ^{aB} | 0,4 ± 0,02 ^{bB} | 354 ± 3,6 ^b | 11,0 ± 2,11 ^b | 0,7 ± 0,03 ^a | 390 ± 4,0 ^a |
| FI 2 | | | | | | |
| 1 | 60,1 | 0,4 | 360 | 10,3 | 0,7 | 387 |
| 2 | 88,6 | 0,7 | 354 | 3,6 | 0,5 | 393 |
| 3 | 68,8 | 0,6 | 362 | 8,2 | 0,7 | 396 |
| 4 | 124 | 1,0 | 336 | 6,4 | 0,7 | 395 |
| 5 | 108 | 1,0 | 340 | 16,5 | 0,9 | 385 |
| Media ± SEM | 90 ± 12 ^{aA} | 0,7 ± 0,12 ^{aA} | 350 ± 5,3 ^b | 9,0 ± 2,17 ^b | 0,7 ± 0,06 ^a | 391 ± 2,2 ^a |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar de la media de 5 muestras.

Diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Aunque en general los valores obtenidos difieren considerablemente entre las muestras de la misma fórmula, se encontraron diferencias significativas entre las fracciones libre y encapsulada de cada tipo de fórmula, así como entre las fracciones libres de ambas fórmulas.

En relación con la evolución oxidativa de las fracciones libres, el IP y los polímeros indican que FI 1 fue más estable que FI 2. La pérdida de tocoferoles en ambas fracciones fue baja, entre 4-7% y no se detectó olor a rancio en ninguna de las muestras.

Todos los parámetros indican que las fracciones libres se oxidaron más que sus correspondientes fracciones encapsuladas, y no se encontraron diferencias significativas entre las fracciones encapsuladas de FI 1 y FI 2.

Los resultados están de acuerdo con los obtenidos en condiciones aceleradas de oxidación, es decir a 30 °C y en presencia de aire (**Tablas 4.34 y 4.35, Figuras 4.36 y 4.37**). Así, las fórmulas infantiles de inicio FI 1 (basadas en una matriz formada por lactosa como componente mayoritario) mostraron una oxidación más lenta de la fracción de aceite libre, lo que resulta en una vida útil mayor en comparación con las muestras de continuación FI 2 (constituidas por una matriz que incluye maltodextrinas como hidratos de carbono mayoritarios). Por tanto, las diferencias en el comportamiento oxidativo de FI 1 y FI 2 podrían estar relacionadas con el diferente perfil de hidratos de carbono en la matriz de encapsulación, como también se había observado en las muestras de aceite de girasol microencapsulado preparadas por atomización en planta piloto, LA70 y MA70.

Resumen de resultados

La evaluación de la oxidación en muestras de alimentos representativos de aceites microencapsulados, un producto lácteo en polvo con aceite rico en CLA y dos tipos de fórmulas infantiles, ha demostrado la utilidad de los métodos analíticos utilizados en esta Tesis para profundizar en el comportamiento oxidativo de estos productos y en la determinación de su vida útil.

En los alimentos ensayados, el análisis de las fracciones de aceite libre y encapsulado ha sido esencial para explicar la evolución de la oxidación de las muestras durante su almacenamiento y determinar su estabilidad oxidativa. Por ejemplo, en el caso de las fórmulas infantiles, la aparición de la rancidez y, por tanto, el final de la vida útil, está relacionado sólo con la oxidación de la fracción de aceite libre.

En el producto lácteo en polvo con aceite rico en CLA la formación de compuestos de polimerización ocurrió desde la etapa inicial de la oxidación y estuvo favorecida frente a la formación de hidroperóxidos. Por tanto, el control del estado de oxidación en productos con aceites ricos en CLA no debería ser realizado en base al índice de peróxidos, que es la determinación actualmente establecida. Además los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la cuantificación de la pérdida de sustrato mediante cromatografía de gases, otra medida de la oxidación generalmente utilizada, particularmente en trabajos de investigación, muestra muy baja sensibilidad frente a la determinación de polímeros.

En las fórmulas infantiles, los ensayos en las condiciones de almacenamiento seleccionadas (30 °C y en presencia de aire) condujeron a las mismas conclusiones que los ensayos en las condiciones establecidas para determinar la caducidad de estos productos (envases originales cerrados y temperatura ambiente). Es importante destacar que la muy diferente composición de las fórmulas de inicio y continuación no se reflejó en diferencias importantes en las características fisicoquímicas estudiadas. Sin embargo, la estabilidad oxidativa parece estar relacionada con el perfil de hidratos de carbono, de forma similar a lo observado en los sistemas modelo (punto 4.2.), ya que las fórmulas de inicio, en las cuales la lactosa es el componente mayoritario, mostraron una oxidación más lenta de la fracción de aceite libre, aumentando así su vida útil en comparación con las fórmulas de continuación, formadas por maltodextrinas como hidratos de carbono mayoritarios. Por otra parte, la determinación más utilizada para el control de la oxidación en estos productos, el índice de peróxidos, proporciona resultados infravalorados cuando la extracción del aceite se realiza con el método más utilizado (el método de Folch o sus modificaciones).

En conclusión, en los alimentos constituidos por aceites microencapsulados es esencial determinar la validez de la determinación del estado de oxidación para seleccionar aquella más apropiada para el sustrato analizado y evaluar la influencia de los métodos de extracción en las determinaciones realizadas.

5. CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1ª) Entre los factores estudiados -tipo de matriz de encapsulación, presión de homogeneización y método de secado-, el tipo de matriz de encapsulación fue el factor que ejerció una mayor influencia en las propiedades fisicoquímicas evaluadas de los aceites microencapsulados. La matriz láctea dio lugar a emulsiones mucho más estables, caracterizadas por menor tamaño promedio y menor polidispersión de tamaños de gotas de aceite, que la de maltodextrina. Tras el secado, las muestras con matriz láctea fueron también más estables desde el punto de vista estructural que las de matriz de maltodextrina.

2ª) El aumento de la presión de homogeneización dio lugar a un aumento significativo de la eficacia de encapsulación en las dos muestras estudiadas –lácteas y de matriz de maltodextrina-.

3ª) El método de secado tuvo una mayor influencia en las propiedades fisicoquímicas estudiadas que la presión de homogeneización. La liofilización condujo a eficacias de encapsulación más elevadas en las muestras de maltodextrina que en las lácteas, mientras que mediante atomización se obtuvieron eficacias de encapsulación más altas en las muestras de matriz láctea.

4ª) De los resultados generales obtenidos se puede concluir que las condiciones más adecuadas para la preparación de aceites microencapsulados corresponden a la utilización de matriz láctea, elevadas presiones de homogeneización (70 frente a 15 MPa) y atomización como método de secado.

5ª) En cuanto al comportamiento oxidativo de aceites microencapsulados en sistemas modelos, la extracción de dos fracciones diferenciadas de aceite (libre y encapsulado) y la aplicación de tres determinaciones complementarias, el índice de peróxidos, la pérdida de tocoferoles y la cuantificación de compuestos de polimerización, han proporcionado una información completa y global de la evolución de la oxidación en estos sistemas.

6ª) Independientemente del tipo de matriz, de la presión de homogeneización y del tipo de secado, las fracciones libre y encapsulada mostraron un comportamiento oxidativo muy diferente. En la fracción de aceite libre, la oxidación tuvo lugar de manera continua, con un periodo de inducción definido. Sin embargo, la fracción de aceite encapsulado mostró una oxidación discontinua ya que se encontraron cantidades elevadas de compuestos de

polimerización existiendo aún niveles altos de antioxidantes. Estos resultados indican la coexistencia de gotas de aceite que se oxidan a velocidades de reacción muy diferentes.

7^a) Las muestras preparadas con matriz láctea fueron más estables desde el punto de vista oxidativo que las muestras con matriz de maltodextrina, mostrando la fracción de aceite libre una oxidación más lenta que resultó en un periodo de vida útil más largo. La menor estabilidad estructural inicial de la matriz de maltodextrina se vio además reflejada en cambios en la distribución de aceite durante el almacenamiento.

8^a) El aumento de presión de homogenización y el secado por atomización frente a la liofilización incrementaron la estabilidad oxidativa en los dos tipos de muestras, láctea y de maltodextrina, principalmente en la fracción encapsulada.

9^a) De los resultados generales obtenidos en sistemas modelos se puede concluir que la muestra más estable desde el punto de vista oxidativo fue la preparada con matriz láctea a alta presión y secada mediante atomización.

10^a) En relación con los estudios específicos en alimentos representativos de aceites microencapsulados, es decir, un producto lácteo con aceite rico en ácido linoleico conjugado y dos tipos de fórmulas infantiles, se ha confirmado que la menor estabilidad oxidativa de la fracción de aceite libre, aun siendo la minoritaria, determina la vida útil del producto.

11^a) Estos estudios han demostrado la necesidad de revisar los métodos empleados para el control de la oxidación en aceites microencapsulados comercializados, destacando la ineficacia del índice de peróxidos para sustratos ricos en ácido linoleico conjugado, la baja sensibilidad de la determinación de la pérdida de sustrato y la importante influencia de los métodos de extracción en las determinaciones analíticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, E.C. and Geldart, D. (1999) The use of bulk density measurements as flowability indicators. *Powder Technol.* 102 (2):151-165.

AENOR (1991) Norma UNE 55-023-73 para la determinación del índice de peróxidos. *Catálogo de Normas UNE*, Madrid.

Anandaraman, S. and Reineccius, G.A. (1986) Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technol.* 40 (11): 88-93.

Angulo, A. J., Romera, J. M., Ramírez, M., and Gil, A. (1998). Effects of storage conditions on lipid oxidation in infant formulas based on several protein sources. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1603-1607.

Anwar, H., Weissbrodt, J., and Kunz, B. (2010) Microencapsulation of fish oil by spray granulation and fluid bed film coating. *J. Food Sci.* 75(6): 359-371.

Augustin, MA., Sanguansri, L. and Oliver, CM. (2010) Functional properties of milk constituents: Application for microencapsulation of oils in spray-dried emulsions - A minireview. *Dairy Sci. Tech.*, 90 (2-3): 137-146.

B.O.E. (1989) Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueba la Norma de Calidad para los Aceites y Grasas Calentados. B.O.E. 26(31/01/89).

Bai, YX., Yu, B., Xu, XM., Jin, ZY., Tian, YQ. and Lu, L. (2010) Comparison of encapsulation properties of major garlic oil components by hydroxypropyl beta-cyclodextrin. *Euro. Food Res. Technol.* 231 (4): 519-524.

Baik, M.Y., Suhendro, E.L., Nawar, W.W., McClements, D.J., Decker, E.A. and Chinachoti, P. (2004) Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 355-360.

Bangs, W.E. and Reineccius, G.A. (1990) Characterization of selected materials for lemon oil encapsulation by spray drying. *J. Food Sci.* 55:1356-1358.

Barbosa-Cánovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., and Yan H. (2005) Bulk properties. En *Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality*. G.V. Barbosa-Cánovas (ed.). Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York. Pp. 55-90.

Berdeaux, O., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C. (1999) Characterization, quantitation and evolution of monoepoxy compounds formed in model systems of fatty acid methyl esters and monoacid triglycerides heated at high temperature. *Grasas y Aceites* 50: 53-59.

Berdeaux, O., Velasco, J., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M. C. (2002) Evolution of short-chain glycerol-bound compounds in fatty acid methyl esters and monoacid triacylglycerols during thermoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 279 - 285.

Beristain, C.I., Garcia, H.S. and Vernon-Carter, E.J. (2001) Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Food Sci. Technol.- Leb.* 34 (6): 398-401.

- Bhandari, B.R., D'Arcy, B.R. and Bich, L.L.T. (1998) Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J. Agric. Food Chem.* 46:1494-1499.
- Brazel, C. S. (1999) Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World* 44: 388-393.
- Brimberg, U.I. and Kamal-Eldin, A. (2003) On the kinetics of the autoxidation of fats: Substrates with conjugated double bonds. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 105 (1): 17-22.
- Buffo, R.A., Probst, K., Zehentbauer, G., Luo, Z. and Reineccius, G.A. (2002) Effects of agglomeration on the properties of spray-dried encapsulated flavours. *Flavour Frag. J.* 17 (4): 292-299.
- Buma, T.J. (1966) The physical structure of spray milk powder and the changes which take place during moisture absorption. *Neth. Milk Dairy J.* 20: 91-111.
- Buma, T.J. (1968) A correlation between free fat content and moisture content of whole milk spray powders. *Neth. Milk Dairy J.* 22: 22-28.
- Buma, T.J. (1971a) Free fat in spray-dried whole milk 8. The relation between free-fat content and particle porosity of spray-dried whole milk. *Neth. Milk Dairy J.* 25: 123-140.
- Buma, T.J. (1971b) Free fat in spray-dried whole milk 10. A final report with a physical model for free-fat content in spray-dried milk. *Neth. Milk Dairy J.* 25: 159-174.
- Burkow, I.C. and Henderson, R.J. (1991) Isolation and quantification of polymers from autoxidized fish oils by high-performance size-exclusion chromatography with an evaporative mass detector. *J. Chromatogr.* 552: 501-506.
- Burvall, A., Asp, N.G., Bosson, A., San Jose, C. and Dahlgvist, A. (1978) Storage of lactose-hydrolysed dried milk: effect of water activity on the protein nutritional value. *J. Dairy Res.* 45 (3): 381-389.
- Bustos, R., Romo, L., Yáñez, K., Díaz, G. and Romo, C. (2003) Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *J. Food Eng.* 56: 289-293.
- Byrdwell, Wm.C. and Neff, W.E. (2002) Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid Commun. Mass Sp.* 16 (4): 300-319.
- Calvo, P., Hernandez, T., Lozano, M., and Gonzalez-Gomez, D. (2010) Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 112 (8): 852-858.
- Celestino, E.L., Iyer, M. and Roginski, H. (1997) The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *Int. Dairy J.* 7 (2-3): 119-127.
- Champagne, C.P. and Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotech.* 18 (2): 184-190.

Champion, D., Le Meste, M. and Simatos, D. (2000) Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: Molecular mobility in the glass transition range. *Trends Food Sci. Tech.* 11 (2): 41-55.

Chan, H.W.-S. and Levett, G. (1977) Autoxidation of methyl linoleate. Separation and analysis of isomeric mixtures of methyl linoleate hydroperoxides and methyl hydroxylinoates. *Lipids* 12: 99-104.

Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I. and López-Sabater M.C. (2008) Volatile compounds and fatty acid profiles in commercial milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography: Evolution after opening the packet. *Food Chem* 107: 558-569.

Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., Martín, M., Chifré, R. and López-Sabater M.C. (2009) Stability during storage of LC-PUFA-supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk. *Food Chem* 113: 484-492.

Cho, Y.H. and Park, J. (2002) Characteristics of double-encapsulated flavor powder prepared by secondary fat coating process. *J. Food Sci.* 67 (3): 968-972.

Cho, Y.-J., Alamed, J., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2003) Ability of chelators to alter the physical location and prooxidant activity of iron in oil-in-water emulsions. *J. Food Sci.* 68 (6): 1952-1957.

Choe, E. and Min, D.B. (2007) Chemistry of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* 72 (5): R77-R86.

Chung, C., Sanguansri, L., and Augustin, M.A. (2010) Resistant starch modification: effects on starch properties and functionality as co-encapsulant in sodium caseinate-based fish oil microcapsules. *J. Food Sci.* 75 (9): 636-642.

Chuy, L.E. and Labuza, T.P. (1994) Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition. *J. Food Sci.* 59: 43-46.

De la Presa-Owens, S., López-Sabater, C. and Rivero-Urgell, M. (1995) Shelf-Life Prediction of an Infant Formula Using an Accelerated Stability Test (Rancimat). *J. Agric. Food Chem.* 43, 2879-2882

De Vilder, J., Martens, R. and Naudts, M. (1976) Influence of process variables on some whole milk powders characteristics. *Milchwissenschaft* 31: 396-401.

De Vos, P., Faas, M. Spasojevic, M and Sikkema, J (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20 (4): 292-302.

Desobry, S.A., Netto, F.M. and Labuza, T.P. (1997) Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J. Food Sci.* 62: 1158-1162.

Desobry, S.A., Netto, F.M. and Labuza, T.P. (1999) Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *J. Food Process. Pres.* 23 (1): 39-55.

Dian, N.L.H.M., Sudin, N. and Yusoff, M.S.A. (1996) Characteristics of microencapsulated palm-based oil as affected by type of wall material. *J.Sci. Food Agric.* 70 (4): 422-426.

Dijkink, B.H., Speranza, L., Paltsidis, D. and Vereijken, J.M. (2007) Air dispersion of starch-protein mixtures: A predictive tool for air classification performance. *Powder Technol.* 172 (2): 113-119.

Dobarganes, M.C., Pérez-Camino, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (1988) High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Fat Sci. Technol.* 90: 308-311.

Dobarganes, C., Márquez-Ruiz, G. and Velasco, J. (2000a) Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102 (8-9): 521-528.

Dobarganes, M.C., Velasco, J. and Dieffenbacher, A. (2000b) The determination of polar compounds, polymerized triacylglycerols, oxidized triacylglycerols and diacylglycerols in fats and oils. *Pure Appl. Chem.* 72: 1563-1575.

Dobarganes, M.C. and Velasco, J. (2002) Analysis of lipid hydroperoxides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 (7): 420-428.

Dobarganes, M. C. and Márquez-Ruiz, G. (2006) "Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides" in Erickson M D, Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications, 2nd edition, Illinois, American Oil Chemists' Society, 87-110.

Dobarganes, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (2007) Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides, in Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications. 2nd Edition, Ed. AOCS, Champaign, IL, USA, Pp. 87-110.

Drusch S. and Schwarz K. (2006a) Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *Euro. Food Res. Technol.* 222: 155-164.

Drusch, S., Serfert Y. and Schwarz, K. (2006b) Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. *Eur. J. Lipid Sci. and Technol.* 108 (6): 501-512.

Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A. and Schwarz, K. (2006c) Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Res. Int.* 39 (7): 807-815.

Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schmidt-Hansberg, B. and Schwarz, K. (2007) Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.* 55 (26): 11044-11051.

Drusch, S. and Berg, S. (2008) Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem.* 109 (1): 17-24.

Drusch, S. and Mannino, S. (2009) Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends Food Sci. Tech.* 20 (6-7): 237-244.

Elversson, J. and Millqvist-Fureby, A. (2005) Particle size and density in spray drying - Effects of carbohydrate properties. *J. Pharm. Sci.* 94 (9): 2049-2060.

Faldt, P. and Bergenstahl, B. (1994) The surface composition of spray-dried protein-lactose powders. *Colloid and Surface A*. 90 (2-3):183-190.

Faldt, P. and Bergenstahl, B. (1995) Fat encapsulation in spray-dried food powders. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 171-176.

Faldt, P. and Bergenstahl, B. (1996) Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsions. 1. Surface composition and particle structure. *Food hydrocolloids* 10: 421-429.

Fang, X., Watanabe, Y., Adachi, S., Matsumura, Y., Mori, T., Maeda, H., Nakamura, A., Matsuno, R. (2003) Microencapsulation of linoleic acid with low- and high-molecular-weight components of soluble soybean polysaccharide and its oxidation process. *Biosci. Biotech. Bioch.* 67 (9): 1864-1869.

Fang, X., Shima, M. and Adachi, S. (2005) Effects of drying conditions on the oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic by spray-drying. *Food Sci. Technol. Res.* 11: 380-384.

Fang, X., Kikuchi, S., Shima, M., Kadat, M., Tsuno, T. and Adachi, S. (2006) Suppressive effect of alkyl ferulate on the oxidation of microencapsulated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 97-102.

Fennema, O.R. (2000) Agua y hielo. En Química de los Alimentos. 2ª Edición. O.R. Fennema (ed.). Ed. Acribia, S.A. , Zaragoza (España). Pp. 19-109.

Finney, J., Buffo, R. and Reineccius, G.A. (2002) Effects of type of atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *J. Food Sci.* 67 (3): 1108-1114.

Fioriti, J.A., Stahl, H.D., Cseri, J. and Sims, R.J. (1975) Chemical and organoleptic properties of dried emulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 395-399.

Flink, J. and Karel, M. (1970a) Retention of organic volatiles in freeze-dried solutions of carbohydrates. *J. Agric. Food Chem.* 18: 295-297.

Flink, J. and Karel, M. (1970b) Effects of process variables on retention of volatiles in freeze-drying. *J. Food Sci.* 35: 444-447.

Folch, J., Ascoli, I., Lees, M. and Meath, J.A. (1951) Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191(2): 833-841

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Frankel, E.N., Neff, W.E. and Miyashita, K. (1990) Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. II. Trilinolenoylglycerol. *Lipids* 25: 40-47.

Frankel, E.N., Huang, S.-W., Kanner, J. and German, J.B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1054-1059.

Frankel, E.N. (1998) Free radical oxidation, en "Lipid oxidation". Ed. E.N. Frankel, The Oily Press, Dundee, UK, pp. 13-22.

- Frankel, E. N. (2005) "Lipid Oxidation", Bridgwater, England, The Oily Press.
- Fritsch, C.W. (1994) Lipid oxidation-the other dimensions. *INFORM 5*: 423-431.
- Fritsche, J., Rickert, R., Steinhart, H., Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M. and Sehat, N. (1999) Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: Formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Fett-Lipid* 101 (8): 272-276.
- García-Llatas, G., Lagarda, M. J., Romero, F., Abellán, P., and Farre, R. (2006). A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. *Food Chem.* 101: 1078-1086.
- García-Martínez, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (2009) Lipid oxidation in functional dairy products. *Curr. Nutr. Food Sci.* 5 (3): 209-216.
- García-Martínez, M.C., Márquez-Ruiz, G., Fontecha, J. and Gordon, M.H. (2009) Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chem.* 113 (4): 926-931.
- Gardner, H.W. (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 65-86.
- Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H. and Moughan, P.J. (2006) Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *J. Food Sci.* 71: 66-71.
- Gejl-Hansen, F. and Flink, J.M. (1977) Freeze-dried carbohydrate containing oil-in-water emulsions: microstructure and fat distribution. *J. Food Sci.* 42: 1049-1055.
- Geldart, D., Abdullah, E.C, and Verlinden, A. (2009) Characterisation of dry powders. *Powder Technol.* 190: 70-74.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40 (9): 1107-1121.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C.N. (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50: 213-224.
- Gonnet, M., Lethuaut, L. and Boury, F. (2010) New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control Release* 146 (3): 276-290.
- Gouin, S. (2004) Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Tech.* 15 (7-8): 330-347.
- Grattard, N., Salaün, F., Champion, D., Roudaut, G. and Le Meste, M. (2002) Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. *J. Food Sci.* 67: 3002-3010.
- Gray, D.A., Bowen, S.E., Farhat, I. and Hill, S.E. (2008) Lipid oxidation in glassy and rubbery-state starch extrudates. *Food Chem.* 106 (1): 227-234.

Grosch, W. (1987) Reactions of hydroperoxides-products of low molecular weight, in "Autoxidation of unsaturated lipids". Ed. H.W.-S- Chan, Academic Press, Londres, pp. 95-139.

Guillén, M.D. and Cabo, N. (2000) Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *J. Sci. Food Agric.* 80 (14): 2028-2036.

Guillén, M.D., Ruiz, A. and Cabo, N. (2004) Study of the oxidative degradation of farmed salmon lipids by means of Fourier transform infrared spectroscopy. Influence of salting. *J. Sci. Food Agric.* 84 (12): 1528-1534.

Guillén, M.D. and Goicoechea, E. (2007) Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage. *J. Agric. Food Chem.* 55 (26): 10729-10736.

Guillén, M.D. and Goicoechea, E. (2009) Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from ^1H nuclear magnetic resonance data. *Food Chem.* 116 (1): 183-192.

Halliwell, B. and Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715S-725S.

Hämäläinen, T.I., Sundberg, S., Hase, T. and Hopia, A. (2002) Stereochemistry of the hydroperoxides formed during autoxidation of CLA methyl ester in the presence of α -tocopherol. *Lipids*, 37 (6): 533-540.

Hämäläinen, T.I. and Kamal-Eldin, A. (2005) Analysis of lipid oxidation products by NMR spectroscopy. In: A. Kamal-Eldin and J. Pokorný, Editors, Analysis of Lipid Oxidation, AOCS Press, Champaign, IL, USA (2005), pp. 70–126.

Hansen F. and Flink J.M. (1977) Freeze-dried carbohydrate containing oil-in-water emulsions: microstructure and fat distribution. *J. Food Sci* 42 (4): 1049-1055

Haque Md.K. and Roos Y.H. (2005) Crystallization and x-ray diffraction of crystals formed in water-plasticized amorphous spray-dried and freeze-dried lactose/protein mixtures. *J. Food Sci.* 70 (5): 350-358.

Haque Md.K. and Roos Y.H. (2006) Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innov. Food Sci. Emerg.* 7: 62-73.

Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J.L., Nawar, W.W. and Chinachoti, P. (2000) Accelerated stability studies of microencapsulated anhydrous milk fat. *Lebnsn.-Wiss. U.-Technol* 33: 506-513.

Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J.L., Nawar, W.W. and Chinachoti, P. (2002) Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2: 151-158.

Heinzelmann, K., Franke, K., Velasco, J. and Márquez-Ruiz, G. (2000) Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 211: 234-239.

- Hogan, S.A., McNamee, B.F., O'Riordan E.D. and O'Sullivan, M. (2001a) Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *Int. Dairy J.* 11:137-144.
- Hogan, S.A., McNamee, B.F., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M. (2001b) Microencapsulating properties of whey protein concentrate 75. *J. Food Sci.* 66 (5): 675-680.
- Hogan, S.A., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M. (2003) Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *J. Microencapsulation* 20: 675-688.
- Hu, ZX. and Zhong, QX. (2010) Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. *Food Chem.* 123 (3): 794-799.
- Huang, S.-W., Frankel, E.N. and German, J.B. (1994) Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2108-2114.
- Imagi, J., Yamanouchi, T., Okada, K., Tanimoto, M. and Matsuno, R. (1992) Properties of agents that effectively entrap liquid lipids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 477-480.
- Ishikawa, T., Watanabe, Y., Takayama, K., Endo, H. and Matsumoto, M. (2000) Effect of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) on the release profiles and bioavailability of a poorly water-soluble drug from tablets prepared using macrogol and HPMC. *Int. J. Pharm.* 202: 173-178.
- IUPAC (1992a) Method 2.508. Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn. Pergamon, Oxford.
- IUPAC (1992c) Method 2.301. Preparation of the fatty acid methyl esters. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn. Pergamon, Oxford.
- IUPAC (1992d) Method 2.302. Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn. Pergamon, Oxford.
- IUPAC (1992e) Method 2.432. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn. Pergamon, Oxford.
- Jackson, L.S. and Lee, K. (1991) Microencapsulation and the food industry. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 24: 289-297.
- Janiszewska, E. and Witrowa-Rajchert, D. (2009) The influence of powder morphology on the effect of rosemary aroma microencapsulation during spray-drying. *Eur. J. Lipid Sci. and Technol.* 44: 2438-2444
- Jimenez, M., Garcia, H.S. and Beristain, C.I. (2004) Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Euro. Food Res Technol.* 219 (6): 588-592.
- Jimenez, M., Garcia, H.S. and Beristain, C.I. (2006) Spray-dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *J. Sci. Food Agric.* 86 (14): 2431-2437.

Jimenez, M., Garcia, H.S. and Beristain, C.I. (2008) Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). *LWT Food Sci. Technol.* 41 (6): 1047-1052.

Jimenez, M. Garcia, H.S and Beristain, C.I. (2010) Effect of water activity on physical properties of CLA (conjugated linolenic acid) microcapsules. *J. Food Proc. Eng.* 33 (3): 434-447

Joeckel, R.J. and Phillips, S.K. (2009) Overview of infant and pediatric formulas. *Nutr. Clin. Pract.* 24 (3): 356-362.

Jonsdottir, R., Bragadottir, M. and Arnarson, G.O. (2005) Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *J. Food Sci.* 70 (7): 443-440.

Jouppila, K., Kansikas, J. and Roos, Y.H. (1997) Glass Transition, Water Plasticization, and Lactose Crystallization in Skim Milk Powder. *J. Dairy Sci.* 80 (12): 3152-3160.

Jyothi, NVN., Prasanna, PM., Sakarkar, SN., Prabha, KS., Ramaiah, PS. and Srawan, GY. (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* 27 (3): 187-197.

Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T. and Matsumura Y. (2003) Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *J. Food Sci.* 68: 2248-2255.

Kamal-Eldin, A. and Pokorný, J. (Editors) (2005) In "Analysis of Lipid Oxidation", AOCS Press, Champaign, IL, USA.

Karel, M., Labuza, T.P. and Maloney, J.F. (1967) Chemical changes in freeze-dried foods and model systems. *Cryobiology* 3(4): 288-296.

Karel, M. (1992) Kinetics of lipid oxidation, en "Physical chemistry of foods". Ed. H.G. Schwartzberg and R.W. Hartel, Marcel Dekker Inc. New York, pp. 651-668.

Kelly, J., Kelly, P.M. and Harrington, D. (2002) Influence of processing variables on the physicochemical properties of spray dried fat-based milk powders. *Lait* 82 (4): 401-412.

Kelly P.M. (2006) Innovation in milk powder technology. *Int. J. Dairy Technol.* 59 (2): 70-75.

Keogh, M.K. and O'Kennedy, B.T. (1999) Milk fat microencapsulation using whey proteins. *Int. Dairy J.* 9 (9): 657-663.

Keogh, M.K., O'Kennedy, B.T., Kelly, J., Auty, M.A., Kelly, P.M., Fureby, A. and Haahr, A.-M. (2001) Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. *J. Food Sci.* 66 (2): 217-224.

Kikuchi, S., Fang, X., Shima, M., Katano, K., Fukami, H. and Adachi, S. (2006) Oxidation of arachidonoyl glycerols encapsulated with saccharides. *Food Sci. Technol. Res.* 12 (4): 247-251.

Kim, E.H.-J., Chen, X.D. and Pearce, D. (2002) Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloid. Surface B: Biointerfaces* 26 (3):197-212.

- Kim, S.-H., Chang, Y. H. and Kwak, H.-S. (2010) Physicochemical properties of reconstituted milk made from freeze-dried milk powder or spray-dried milk powder. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 30: 28-35.
- Kim, S.J., Park, G.B., Kang, C.B., Park, S.D., Jung, M.Y., Kim, J.O. and Ha, Y.L. (2000) Improvement of oxidative stability of conjugated linoleic acid (CLA) by microencapsulation in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 3922-3929.
- Kim, Y.D. and Morr, C.V. (1996) Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: Spray-dried orange oil emulsion particles. *J. Agric. Food Chem.* 44 (5): 1314-1320.
- Kim, Y.D., Morr, C.V. and Schenz, T.W. (1996) Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: liquid orange oil emulsion particles. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1308-1313.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2005) Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *J. Agric. Food Chem.* 53 (21): 8365-8371.
- Kochhar, S.P. (1993) Oxidative pathways to the formation of off-flavours, en "Food taints and off-flavours". Ed. M.J. Saxby, Chapman and Hall, Glasgow, UK, pp. 150-201.
- Kolanowski, W. and Laufenberg, G. (2006) Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *Eur. Food Res. and Technol.* 222 (3-4): 472-477.
- Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weissbrodt, J., Kunz, B. and Laufenberg, G. (2006) Microencapsulation of fish oil by spray drying - Impact on oxidative stability. Part 1. *Eur. Food Res. Technol.* 222 (3-4): 336-342.
- Kopelman, I.J., Meydav, S. and Wilmersdorf, P. (1977) Freeze-drying encapsulation of water soluble citrus aroma. *J. Food Technol.* 12: 65-72.
- Kuang, SS., Oliveira, J. C. and Crean, A. M. (2010) Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 50 (10): 951-968.
- Labrousse, S., Roos, Y. and Karel, M. (1992) Collapse and cristallization in amorphous matrices with encapsulated compounds. *Sci. Aliment.* 12: 757-769.
- Labuza T.P. (1968) Sorption phenomena in foods. *Food Technol.* 22: 15-24.
- Labuza, T.P. (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 2: 355-405.
- Lagarda, MJ., Mañez, J.G., Manglano, P. and Farré, R. (2003) Lipid hydroperoxides determination in milk-based infant formulae by gas chromatography. *Eur J Lipid Sci Technol* 105: 339-345
- Laübli, M.W. and Bruttel, P.A. (1986) Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 792-794.

Lee, J.-S., Song, Y.-B., Lee, J.Y., Kim, M.K., Jun, S.J. and Lee, H.G. (2009) Optimization and oxidative stability of the microencapsulated conjugated linoleic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (4): 348-351.

Levine, H. and Slade, L. (1990) Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical, and structural properties of doughs and baked products. En: "Dough Rheology and Baked Product Texture". Ed. AVI, New York. pp.157-330.

Lin, C.G., Lin, S.Y. and Hwang, L.S. (1995) Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *J. Food Sci.* 60: 36-39.

Liu, Y., Bhandari, B. and Zhou, W. (2006) Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: A review. *J. Agric. Food Chem.* 54 (16): 5701-5717.

Loksuwan, J. (2007) Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloid.* 21 (5-6): 928-935.

Lumdubwong, N. and Seib, P.A. (2001) Low- and medium-DE maltodextrins from waxy wheat starch: Preparation and properties. *Starch/Staerke*, 53 (12): 605-615.

Luna, P., De La Fuente, M.A., Salvador, D. and Márquez-Ruiz, G. (2007) Differences in oxidation kinetics between conjugated and non-conjugated methyl linoleate. *Lipids*, 42 (12): 1085-1092.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release - A review. *Int. J. Food Sci. Techn.* 41 (1): 1-21.

Magdassi, S. and Vinetsky, Y. (1996) Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. En: Microencapsulation. Edit: Benita S. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 21-34.

Malpuech-Brugere, C., Verboeket-van de Venne, W. P. H. G., Mensink, R. P., Arnal, M. A., Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T. S., Chardigny J. M., Sebedio J. L., and Beaufre, B. (2004) Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obes. Res.* 12:591-598.

Manglano, P., Lagarda, M.J., Silvestre, M.D., Vidal, C., Clemente, G. and Farré, R. (2005) Stability of the lipid fraction of milk-based infant formulas during storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 815-823

Marmesat, S., Velasco, J. and Dobarganes, M.C. (2008) Quantitative determination of epoxy acids, keto acids and hydroxy acids formed in fats and oils at frying temperatures. *J. Chromatogr. A* 1211 : 129-134.

Márquez-Ruiz G., Jorge N., Martín-Polvillo M. and Dobarganes M.C. (1996a) Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *Grasas y Aceites* 749: 55-60.

Márquez-Ruiz G., Martín-Polvillo M. and Dobarganes M.C. (1996b) Quantitation of oxidized triglyceride monomers and dimers as a useful measurement for early and advanced stages of oxidation. *Grasas y Aceites* 47: 48-53.

Márquez-Ruiz G., Martín-Polvillo M., Jorge, N., Ruiz-Méndez, M.V. and Dobarganes M.C. (1999) Influence of used frying oil quality and natural tocopherol content on oxidative stability of fried potatoes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 421-425.

Márquez-Ruiz, G., Velasco, J. and Dobarganes, C. (2000) Evaluation of oxidation in dried microencapsulated fish oils by a combination of adsorption and size exclusion chromatography. *Euro. Food Res. Technol.* 211 (1): 13-18.

Márquez-Ruiz, G.; Martín-Polvillo, M. and Dobarganes, M.C. (2003a) Effect of temperature and addition of alpha-tocopherol on the oxidation of trilinolein model systems. *Lipids* 38, 233-240.

Márquez-Ruiz, G., Velasco, J. and Dobarganes, M.C. (2003b) Oxidation in dried microencapsulated oils. En: *Lipid Oxidation Pathways*. Editor: Kamal-Eldin, A. AOCS Press, Champaign, Illinois, 245-264.

Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C. (2005) Analysis of non-volatile lipid oxidation compounds by high-performance size-exclusion chromatography. In: *Analysis of Lipid Oxidation*. Ed. A. Kamal-Eldin and J. Pokorny (eds). American Oil Chemists' Society (Champaign, Illinois). Pp. 40-69.

Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C. (2006) HPSEC in lipid analysis. In: *Lipid Analysis and Lipidomics: New Techniques and Applications*, Ed. AOCS, Champaign, IL, USA. Pp. 205-238.

Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., García-Martínez, M.C. and Dobarganes, M.C. (2007) A direct and fast method to monitor lipid oxidation progress in model fatty acid methyl esters by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1165 :122-127.

Márquez-Ruiz, G., Velasco, J. and Holgado, F. (2010) Aceites microencapsulados. Capítulo vol. III - Aplicaciones en "Temas selectos en Aceites y Grasas". Editorial Blucher

Martín-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G., Jorge, N., Ruiz-Méndez, M.V. and Dobarganes, M.C. (1996) Evolution of oxidation during storage of crisps and French fries prepared with sunflower oil and high oleic sunflower oil. *Grasas y Aceites* 47: 54-58.

Martín-Polvillo, M. (2000) Evolución de la alteración oxidativa y formación de nuevos compuestos en sistemas modelo, aceites y alimentos grasos. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

Martín-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C. (2004) Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long term storage at room temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 577-583.

Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S.F., McGee, S.O. and Ip, M.M. (2004) Isomers of Conjugated Linoleic Acid Differ in Their Effects on Angiogenesis and Survival of Mouse Mammary Adipose Vasculature. *J. Nutr.* 134 (2): 299-307.

Matsumara, Y., Satake, C., Egami, M. and Mori, T. (2000) Interaction of gum Arabia, maltodextrin and pullulan with lipids in emulsions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1927-1835.

- Matsuno, R. and Adachi, S. (1993) Lipid encapsulation technology – techniques and applications to food. *Trends in Food Sci. Technol.* 41: 256-261.
- McNamee, B.F., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M. (1998) Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *J. Agric.Food Chem.* 46 (11): 4551-4555.
- Menting, L.C., Hoogstad, B. and Thijssen, H.A.C. (1970) Aroma retention during the drying of liquid foods. *J. Food Technol.* 5: 127-139.
- Michalski, M.C, Calzada, C., Makino, A., Michaud, S. and Guichardant, M.(2008) Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk – A preliminary study. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 1478 – 1485.
- Min, D.B. and Boff, J.M. (2002) Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food F.* 1 (2): 58-72.
- Minemoto Y., Adachi S. and Matsuno R. (1997) Comparison of oxidation of methyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot-air-drying and freeze-drying. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4530-4534.
- Minemoto,Y., Adachi, S. and Matsuno, R. (1999) Autoxidation of linoleic acid encapsulated with polysaccharides of differing weight ratio. *Biosci. Biotech. Bioch.* 63 (5): 866-869.
- Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R. (2001) Effect of Relative Humidity during Storage on the Autoxidation of Linoleic Acid Encapsulated with a Polysaccharide by Hot-Air-Drying and Freeze-Drying. *Food Sci. Technol. Res.* 7 (1): 91-93.
- Minemoto, Y., Fang, X., Hakamata, K., Watanabe, Y., Adachi, S., Kometani, T. and Matsuno, R. (2002a) Oxidation of linoleic acid encapsulated with soluble soybean polysaccharide by spray-drying. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66 (9): 1829-1834.
- Minemoto, Y., Hakamata, K., Adachi, S. and Matsuno, R. (2002b) Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying. *J. Microenc.* 19: 181-189.
- Miquel, E., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. and Clemente, G. (2004) Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *Int. Dairy J.* 14: 1003–1011.
- Miyashita, K., Frankel, E.N., Neff, W.E. and Awl, R.A. (1990) Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. III. Synthetic triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids* 25: 48-53.
- Moreau, D.L. and Rosenberg, M. (1993) Microstructure and fat extractability in microcapsules based on whey proteins or mixtures of whey proteins and lactose. *Food Structure* 12: 457-468.
- Mortenson, MA., Labuza, TP and Reineccius, GA (2010) Moisture sorption isotherms for unmodified and osan-substituted dextrin and gum acacia used as carrier materials for spray dried encapsulation of flavoring materials. *Int J Food Prop.* 13 (5): 992-1001.
- Nasirpour, A., Scher, J. and Desobry, S. (2006) Baby foods: Formulations and interactions (a review). *Crit. Rev. Food Sci.* 46 (8): 665-681.

Neff, W.E. and Frankel, E.N. (1980) Quantitative analyses of hydroxystearate isomers from hydroperoxides by high-pressure liquid chromatography of autoxidized and photosensitized-oxidized fatty esters. *Lipids* 15: 587-590.

Neff, W.E., Frankel, E.N. and Fujimoto, K. (1988) Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epioxides and dihydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 616-623.

Neff, W.E., Selke, E., Mounts, T.L., Rinsch, W., Frankel, E.N. and Zeitoun, M.A.M. (1992) Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 111-118.

Nielsen, B.R., Stapelfeldt, H. and Skibsted, L.H. (1997) Early prediction of the shelf-life of medium-heat whole milk powders using stepwise multiple regression and principal component analysis. *Int. Dairy J.* 7 (5): 341-348.

Orlien, V., Andersen, A.B., Sinkko, T and Skibsted, L.H. (2000) Hydroperoxide formation in rapeseed oil encapsulated in a glassy food model as influenced by hydrophilic and lipophilic radicals. *Food Chem.* 68: 191-199.

Orlien, V., Risbo, J., Rantanen, H. and Skibsted, L.H. (2006) Temperature-dependence of rate of oxidation of rapeseed oil encapsulated in a glassy food matrix. *Food Chem.* 94 (1): 37-46.

Paramita, V., Furuta, T. and Yoshii, H (2010) Microencapsulation efficacy of d-Limonene by spray drying using various combinations of wall materials and emulsifiers. *Food Sci. Technol. Res.* 16 (5): 365-372.

Pariza, M.W., Park, Y. and Cook, M.E. (2000) Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 223 (1): 8-13.

Park, D.K., Terao, J. and Matsushita, S. (1981) High-performance liquid chromatography of hydroperoxides formed by autoxidation of vegetable oils. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2443-2448.

Partanen, R., Hakala, M., Sjoval, O., Kallio, H. and Forsell, P. (2005) Effect of relative humidity on the oxidative stability of microencapsulated sea buckthorn seed oil. *J. Food Sci.* 70: E37-E43.

Partanen, R., Raula J., Seppanen, R., Buchert, J., Kauppinen, E. and Forsell, P. (2008) Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 56 (14): 5717-5722.

Pauletti, M.S. and Amestoy, P. (1999) Butter microencapsulation as affected by composition of wall material and fat. *J. Food Sci.* 64 (2): 279-282.

Pedroza-Islas R., Vernon-Carter E.J., Duran-Dominguez C. and Trejo-Martinez S. (1999) Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation - I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Res. Int.* 32 (5): 367-374.

Pokorny, J. (1987) Major factors affecting the autoxidation of lipids, in "Autoxidation of unsaturated lipids". Ed. H.W.-S- Chan, Academic Press, Londres, pp. 141-205.

- Pokorný, J., Schmidt, S. and Parkányiová, J. (2005) 'Ultraviolet-visible spectrophotometry in the analysis of lipid oxidation' in Kamal-Eldin A and Pokorný J, *Analysis of Lipid Oxidation*, Illinois, American Oil Chemists' Society Press, 17-39.
- Ponginebbi, L., Nawar, W.W. and Chinachoti, P. (2000) Effect of relative humidity on lipid oxidation in freeze-dried emulsions. *Grasas y Aceites* 51: 348-354.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. and Mills, K.A. (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30: 277-290.
- Porter, W.L. (1980) Recent trends in food applications of antioxidants, en "Autoxidation in foods and biological systems". Ed. M. Simic and G. Karel, Plenum Press, New York, pp. 295-365.
- Pryor, W.A., Stanley, J.P. and Blair, E. (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11: 370-379.
- Reineccius, G.A. (2001) The spray drying of food ingredients. En: *Microencapsulation of Food Ingredients*. P. Vilstrup (ed.). Leatherhead Publishing, Surrey, England. Pp.151-185.
- Richardson, G.H. (1985) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 15th Edition; American Public Health Association, Washington DC, p. 358.
- Rocha-Guzman, NE., Gallegos-Infante, JA., Gonzalez-Laredo, RF., Harte, F., Medina-Torres, L., Ochoa-Martinez, LA. and Soto-Garcia, M. (2010) Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of quercus resinosa infusions encapsulated by spray-drying. *J. Food Sci.* 75 (5): 57-61.
- Rodríguez-Álcala, L.M. and Fontecha, J. (2007) Hot topic: Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: Evaluation after processing and storage. *J. Dairy Sci.* 90 (5): 2083-2090.
- Romeu-Nadal, M., Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., Rivero, M. and López-Sabater M.C. (2007) Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chem* 100: 756-763.
- Roos, Y.H. and Karel, M. (1991) Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnol. Prog.* 7: 49-53.
- Roos, Y.H. (2002) Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Lait*, 82 (4): 475-484.
- Rosenberg, M., Kopelman, I.J. and Talmon, Y. (1990) Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J. Agric. Food Chem.* 38 (5): 1288-1294.
- Rosenberg, M., and Young, S.L. (1993) Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat — Structure evaluation. *Food Struct.* 12: 31–41.
- Rossell, J.B. (1992) Measuring resistance to oxidative rancidity. *Lipid Technol.* March-April: 39-44.

- Rossell, J.B. (1994) Measurements of Rancidity in "Rancidity of Foods". J.C. Allen and R.J. Hamilton (Ed.), Chapman & Hall, Glasgow, pp. 22-53.
- Rulkens, W.H. and Thijssen, H.A.C. (1972). Retention of volatile compounds in freeze-drying slabs of maltodextrin. *J. Food Technol.* 7: 79-93.
- Rusli, J.K., Sanguansri, L. and Augustin M.A: (2006) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83 (11): 965-972.
- Saltmarch, M. and Labuza, T.P. (1980) Influence of relative humidity on the physicochemical state of lactose in spray-dried sweet whey powders. *J. Food Sci.* 45: 1231-1236.
- Sánchez-Muniz, F.J., Bodega, D.Z., Di Lorenzo, L., Marmesat, S., Bastida, S., Perez-Olleros, L. and Ruiz-Roso, B. (2007) A non-extractable condensed-tannins fiber reduces thermal oxidation in oils at frying temperature. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (12): 1218-1225.
- Sankarikutty, B., Sreekumar, M.M., Narayanan, C.S. and Mathew, A.G. (1988) Studies on microencapsulation of cardamon oil by spray-drying technique. *J. Food Sci. Technol.* 25:352-356.
- Schneider, C. (2009) An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (3): 315-321.
- Schorio, A. L., Manthey, F.A. and Hall III, C.A. (2010) Effect of particle size and sample size on lipid stability of milled flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Process. Pres.* 34 (1): 167-179.
- Selim, K., Tsimidou, M. and Biliaderis, C.G. (2000) Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chem.* 71 (2): 199-206.
- Serfert, Y., Drusch, S. and Schwarz, K. (2009a) Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chem.* 113 (4): 1106-1112.
- Serfert, Y., Drusch, S., Schmidt-Hansberg, B., Kind, M. and Schwarz, K. (2009b) Process engineering parameters and type of n-octenylsuccinate-derivatised starch affect oxidative stability of microencapsulated long chain polyunsaturated fatty acids. *J. Food Eng.* 95 (3): 386-392.
- Serfert, Y., Drusch, S. and Schwarz, K (2010) Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chem.* 123 (4): 968-975.
- Shahidi, F. and Han, X.-Q. (1993) Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 501-547.
- Shahidi, F. (1998) Functional seafood lipids and proteins in "Functional foods: biochemical and processing aspects". Ed. G. Mazza, Technomic Publ., Lancaster, USA, pp. 381-401.
- Shaw, L.A., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2007) Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for ω -3 fatty acids into food systems. *J. Agric. Food Chem.* 55 (8): 3112-3119.

Shen, Z., Augustin, M.A., Sanguansri, L. and Cheng, L.J. (2010) Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil Powders Stabilized by Blends of Chitosan, Modified Starch, and Glucose. *J. Agric. Food Chem.* 58 (7): 4487–4493.

Sheu, T.-Y., and Rosenberg, M. (1995) Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *J. Food Sci.* 60: 98–103.

Shimada, Y., Roos, Y. and Karel, M. (1991) Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food model. *J. Agric. Food Chem.* 39: 637-641.

Shukla, V.K.S. and Perkins, E.G. (1991) The presence of oxidative polymeric materials in encapsulated fish oils. *Lipids.* 26 (1): 23-26.

Silalai, N. and Roos, YH. (2010) Roles of water and solids composition in the control of glass transition and stickiness of milk powders. *J. Food Sci.* 75 (5): 285-296.

Sims, R.J. (1994) Oxidation of fats in food products. *INFORM* 5: 1020-1028.

Sjövall, O., Kuksis, A. and Kallio, H. (2001) Analysis of molecular species of peroxide adducts of triacylglycerols following treatment of corn oil with tert-butyl hydroperoxide. *Lipids* 36: 1347-1356.

Sjövall, O., Kuksis, A. and Kallio, H. (2002). Formation of triacylglycerol core aldehydes during rapid oxidation of corn and sunflower oils with tert-butyl hydroperoxide/ Fe^{2+} . *Lipids* 37: 81-94.

Sootitawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. and Linko, P. (2003) Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *J. Food Sci.* 68 (7): 2256-2262.

Sootitawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. and Linko, P. (2005) Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innov. Food Sci. Emerg.* 6 (1) :107-114.

St. Angelo, A.J. (1996) Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 36: 175-224.

Stapelfeldt, H., Meisen, B.R. and Skibsted, L.H. (1997a) Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *Int. Dairy J.* 7 (5): 331-339.

Suomela, J.P., Ahotupa, M., Sjövall, O., Kurvinen, J.P. and Kallio, H. (2004) Diet and lipoprotein oxidation: Analysis of oxidized triacylglycerols in pig lipoproteins. *Lipids* 39: 639-647.

Suomela, J.P., Ahotupa, M. and Kallio, H. (2005) Triacylglycerol oxidation in pig lipoproteins after a diet rich in oxidized sunflower seed oil. *Lipids* 40: 437-444.

Taguchi, K., Iwami, K., Ibuk, F. and Kawabata, M. (1992) Oxidative stability of sardine oil embedded in spray-dried egg white powder and its use for n-3 unsaturated fatty acid fortification of cookies. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 560-563.

Tamsma, A. and Pallansch, M.J. (1964) Factors related to the storage stability of foam-dried whole milk. IV. Effect of powder moisture content and in-pack oxygen at different storage temperatures. *J. Dairy Sci.*, 47: 970-976.

Tan, C.P. and Che Man, Y.B. (2002) Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: Effects of scanning rate variation. *Food Chem.* 76 (1): 89-102.

Thomas, D.W., van Kuijk, F.J.G.M., Dratz, E.A. and Stephens, R.J. (1991) Quantitative Determination of Hydroxy Fatty Acids as an Indicator of in Vivo Lipid Peroxidation: Gas Chromatography – Mass Spectrometry Methods. *Anal. Biochem.* 198: 104-111.

Thomas, M., Scher, J., Desobry-Banon, S. and Desobry S. (2004) Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci.* 44: 297-322.

Thompson, D.K. and Kharb, S. (2007) Aspects of infant food formulation. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 6 (4): 79-102.

Tyl C.E., Brecker L. and Wagner K.-H. (2008) ¹H NMR spectroscopy as tool to follow changes in the fatty acids of fish oils. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 110 (2): 141-148.

Vega, C., Kim, E.-H.-J., Chen, X.D. and Roos, Y.H. (2005) Solid-state characterization of spray-dried ice cream mixes. *Colloid. Surface B: Biointerfaces* 45 (2): 66-75.

Vega C. and Roos Y.H. (2006) Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions - Compositional considerations. *J. Dairy Sci.* 89 (2) : 383-401.

Velasco, J., Dobarganes, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (2000a) Oxidation of free and encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oils. *Grasas y Aceites* 51 (6): 439-446.

Velasco, J., Dobarganes, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (2000b) Application of the accelerated test Rancimat to evaluate oxidative stability of dried microencapsulated oils. *Grasas y Aceites* 51 (4):261-267.

Velasco, J., Berdeaux, O., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C. (2002) Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 982: 145-152.

Velasco, J., Dobarganes, C. and Márquez-Ruiz, G. (2003) Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Grasas Aceites* 54 (3): 304-314.

Velasco, J., Marmesat, S., Bordeaux, O., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, C. (2004a) Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and fried food outlets. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4438-4443.

Velasco, J., Andersen, M.L. and Skibsted, L.H. (2004b) Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.* 85 (4):623-632.

Velasco, J., Dobarganes, M.C. and Márquez-Ruiz, G. (2004c) Antioxidant activity of phenolic compounds in sunflower oil-in-water emulsions containing sodium caseinate and lactose. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 106 (5): 325-333.

Velasco, J., Marmesat, S., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M. C. (2005) Quantitation of short-chain glycerol-bound compounds in thermoxidized and used frying oils. A monitoring study during thermoxidation of olive and sunflower oils. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4006-4011.

Velasco, J., Marmesat, S., Dobarganes, C. and Márquez-Ruiz, G. (2006) Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *J. Agric. Food Chem.* 54 (5): 1722-1729.

Velasco J., Marmesat S., Holgado F., Márquez-Ruiz G. y Dobarganes C. Influence of two lipid extraction procedures on the peroxide value in powdered infant formulas (2008) *Euro. Food Res. Technol.* 226 (5): 1159-1166.

Velasco, J., Dobarganes, C., Holgado, F. and Márquez-Ruiz, G. (2009a) A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test. *Food Res. Int.* 42 (1): 56-62.

Velasco, J., Holgado, F., Dobarganes, C. and Márquez-Ruiz, G. (2009b) Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils. *Food Res. Int.* 42 (10): 1492-1500.

Velasco, J., Holgado, F., Dobarganes, C. and Márquez-Ruiz, G. (2009c) Antioxidant activity of added phenolic compounds in freeze-dried microencapsulated sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (5): 445-452.

Velasco, J., Dobarganes, C. and Márquez-Ruiz, G. (2010) Oxidative Rancidity in Foods and Food Quality. En: Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages. : L. Skibsted, J. Risbo and M. Andersen (eds), Woodhead Publishing Limited. Pp. 3-32.

Verleyen, T., Van Dyck, S. and Adams, C.A. (2005) "Accelerated stability tests", in Kamal-Eldin A and Pokorný J, Analysis of Lipid Oxidation, Illinois, American Oil Chemists' Society Press, 210-233.

Vignolles, M.L., Jeantet, R., Lopez, C. and Schuck, P. (2007) Free fat, surface fat and dairy powders : interactions between process and product. A review. *Lait* 87: 187-236.

Vignolles, M.L., Lopez, C., Madec, M.N., Ehrhardt, J.J., Méjean, S., Schuck, P. and Jeantet, R. (2009a) Fat properties during homogenization, spray-drying, and storage affect the physical properties of dairy powders. *J. Dairy Sci.* 92: 58-70.

Vignolles, M.-L., Lopez, C., Ehrhardt, J.-J., Lambert, J., Méjean, S., Jeantet, R. and Schuck, P. (2009b) Methods' combination to investigate the suprastructure, composition and properties of fat in fat-filled dairy powders. *J. Food Eng.* 94 (2): 154-162.

Vignolles, ML., Lopez, C., Le Floch-Fouere, C., Ehrhardt, JJ., Mejean, S., Jeantet, R. and Schuck, P. (2010) Fat supramolecular structure in fat-filled dairy powders: A tool to adjust spray-drying temperatures. *Dairy Sci. Tech.*, 90 (2-3): 287-300.

Villeneuve, P., Lago, R., Barouh, N., Barea, B., Piombo, G., Dupre, J.-Y., Le Guillou, A. and Pina, M. (2005) Production of conjugated linoleic acid isomers by dehydration and isomerization of castor bean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (4): 261-269.

Vuataz, G. (2002) The phase diagram of milk: A new tool for optimising the drying process. *Lait* 82 (4): 485-500.

Waltking, A.E. (1973) Evaluation of methods for the determination of polymers and oxidation products of heated vegetable oils: collaborative study of the gas-liquid chromatographic method for non-elution materials. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58: 898-901.

Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R. (2002) Suppressive effect of saturated acyl L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3984-3987.

Westergaard, V. (1994) Milk powder technology- Evaporation and spray-drying. Niro A/S, Copenhagen, Denmark.

Whigham, L.D., Watras, A.C. and Schoeller, D.A. (2007) Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (5): 1203-1211.

Wilson, R., Smith, R., Wilson, P., Shepherd, M.J. and Riemersma, R.A. (1997) Quantitative Gas Chromatography – Mass Spectrometry Isomer-Specific Measurement of Hydroxy Fatty Acids in Biological samples as a Marker of Lipid Peroxidation. *Anal. Biochem.* 248: 76-85.

Wolff, J.P., Mordret, F.X. and Dieffenbacher, A. (1991) Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* 63: 1163-1171.

Young, S.L., Sarda, X. and Rosenberg, M. (1993a) Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *J. Dairy Sci.* 76: 2868-2877.

Young, S.L., Sarda, X. and Rosenberg, M. (1993b) Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 76: 2878-2885.

Zamora, R., Gómez, G. and Hidalgo, F.J. (2003) Quality control of vegetable oils by ¹³C NMR spectroscopy. En: Webb GA, Belton PS, Gil AM, Rutledge DN, eds. *Magnetic Resonance in Food Science: Latest Developments*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, ppo. 231-238.

